# 1. 2017年度 研究成果

### A 冲中記念成人病研究所専任研究員による基礎的研究

### ヒトLPL遺伝子の転写抑制機序の解明

雨宮 三千代

### 【要約】

リポプロテインリパーゼ(LPL)は血清脂質の クリアランスに重要である一方、マクロファージ に発現するLPLは、動脈硬化における泡沫化の 一因を形成すると考えられている。マクロファー ジLPLの転写調節機構を知ることは、動脈硬化 における泡沫化抑制の手がかりを得る可能性が ある。そこで、ヒトLPLプロモーターのレポー タージーンを作成し、マウスのマクロファージ であるRAW細胞に遺伝子導入をし、LPL遺伝子 の転写抑制に関係する責任シス配列とトランス 因子の同定を試みた。その結果、転写開始点上 流-584bpから-536bpに転写抑制に関わるシス 領域が二つ存在することを発見した。そのうちの 一つはOCTsのコンセンサス配列でOCT1および OCT2が結合し、もう一つは、18bp下流のパリ ンドローム配列であることが判明した。OCT1、 OCT2はOCTコンセンサス配列にモノマーで結 合するが、パリンドローム配列が近傍にあるとダ イマー構造を形成し、安定化すると考えられる。 【背景】

リポプロテインリパーゼ(LPL)は血清脂質のクリアランスに重要である一方、マクロファージに発現するLPLは、動脈硬化における泡沫化の一因を形成すると考えられている。マクロファージLPLの転写調節機構を知ることは、動脈硬化における泡沫化抑制の手がかりを得る可能性がある。そこで、我々はヒトLPLプロモーターのレポータージーンを作成し、マウスのマクロファージであるRAW細胞に遺伝子導入をし、LPL

遺伝子の転写抑制に関係する責任シス配列とトランス因子の同定を試みた。蛍光プローブによるフットプリント解析およびゲルシフト法により、転写開始点上流-584bpから-536bpに転写抑制に関わる二つの領域が存在することを発見した。そのうちの一つはOCTのコンセンサス配列(ATTTGCAT)で、OCT1とOCT2が結合した。もう一つの配列は、下流のパリンドローム構造(AACTAGTT)である。

#### 【目的】

ヒトLPL遺伝子調節領域-550bp付近にある 二つのシス配列に着目し、マウスのマクロファ ージ系細胞であるRAW細胞を用いて、OCT1と OCT2によるLPLプロモーターの転写制御機構 を検討する。

### 【方法】

①自己血ゲノム DNA からLPL遺伝子調節領域  $(-2.87 \,\mathrm{k} \to +50 \,\mathrm{bp})$  をクローニングし、レポータージーン(LPL-Luc)を作製した。RAW 細胞にレポータージーンを遺伝子導入し、転写活性を測定した。②ゲルシフト法により、この領域に結合する転写因子を同定した。③LXR, RXR リガンドを加えたときのLPLmRNAの変化をRT-PCR 法で測定した。

### 【結果】

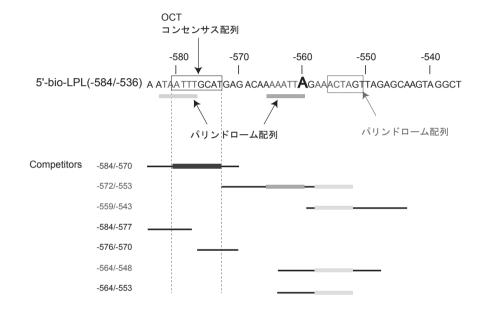
#### 1. シス領域の同定

-584 bpから-536 bpに結合する因子を理化学研究所データベース (TF bind) で検索したところ、OCTコンセンサス配列がヒットした (ATTTGCAT)。

#### 2. ゲルシフト

この領域を含むプローブ(5'-bio-LPL(-584/-536))とRAW細胞の核タンパクを反応させてゲルシフトを行った。OCTコンセンサス配列に結合するタンパクAと、下流の領域に結合するタンパクB、Cが検出された(図1)。次に、当該領域に結合するタンパクの同定を、OCT1抗体を用いて行った(図2)。プローブは、OCT配列と

下流のパリンドロームを含む5'-bio-LPL(-584/-536) プローブと、下流のパリンドロームのみを含む5'-bio-LPL(-575/-540) プローブを使用した(図2-a)。 タンパクは、RAW細胞の核抽出タンパク(RAW NE) およびリコンビナントOCT1を用いた。OCT配列と下流のパリンドロームを含むプローブ(-584/-536) とRAW細胞の核タンパクを用いた場合、二つのバンドX、Yが確認



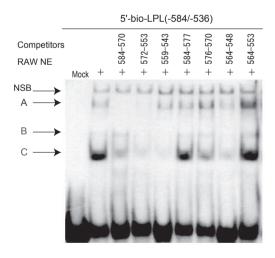
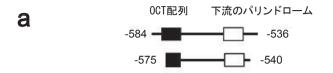
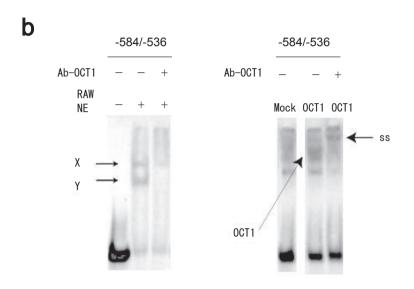


図 1 ヒトLPL遺伝子のゲルシフト RAW 細胞の核タンパクと、5'-ビオチン化DNA プローブ(-584/-536)を反応させ、ゲルシフトを行った。バンドA、B、Cが検出された。





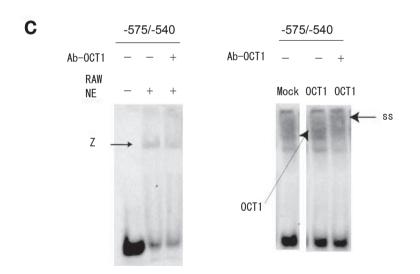


図 2 a) ゲルシフトに使用したプローブ。5'-ビオチン化DNAプローブ(-584/-536)は、OCT配列と下流のパリンドロームを含む。5'-ビオチン化DNAプローブ(-575/-540)は下流のパリンドロームのみ含む。b) 5'側ビオチン化DNAプローブ(-584/-536) と、RAW細胞核タンパク(左図)またはOCT1リコンビナントタンパク(右図)を反応させ、ゲルシフトを行った。OCT1 抗体を加えてタンパクの特定をした。c) 5'側ビオチン化DNAプローブ(-575/-540) と、RAW細胞核タンパク(左図)またはOCT1リコンビナントタンパク(右図)を反応させ、ゲルシフトを行った。OCT1 抗体を加えてタンパクの特定をした。

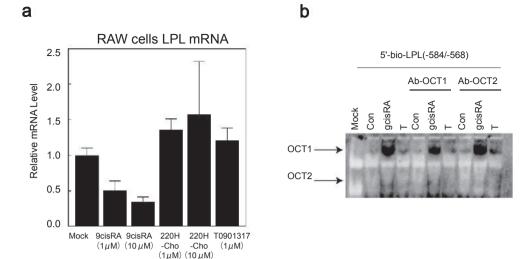


図 3 a) RAW 細胞に9cisRA, 22 OH-Cho, T 0901317 を加えて24 時間後の mRNA を抽出した。 RT-PCR で LPLmRNA を測定した。b) RAW 細胞に9cisRA  $(1 \, \mu\text{M})$  と T 0901317  $(1 \, \mu\text{M})$  を加え24 時間後に核タンパクを抽出した。5'-ビオチン化DNA プローブ(-575/-568)と核タンパクを反応させ、ゲルシフトを行った。OCT 1 抗体、OCT 2 抗体を加えてタンパクの特定を行った。

でき、OCT1抗体でYは完全に、Xのバンドは弱く消失した(図2-b左)。リコンビナントOCT1では、単一のバンドが確認でき、OCT1抗体でスーパーシフト(SS)した(図2-b右)。下流のパリンドロームのみを含むプローブ(-575/-540)では、RAWの核タンパクで単一バンドZが確認でき、OCT1抗体でバンドが薄くなった(図2-c左)。リコンビナントOCT1では、単一のバンドが確認でき、OCT1抗体添加でスーパーシフト(SS)した(図2-c右)。XとZに該当するタンパクは、バンドの位置や、OCT1抗体に対する反応性から、同一タンパクと考える。

#### 3. RT-PCR

薬物によるLPLmRNAの発現を半定量的PCR 法により検討した。RAW細胞にRXRのリガンドである9cis-レチノイン酸(9cisRA)、LXRのリガンドである22-OHコレステロール(22-OH-Cho)およびT0901317を投与し、24時間後、mRNAを抽出し、RT-PCRを行った。9cisRAでは、濃度依存的にLPLmRNA量が低下するのに対し、22-OH-ChoやT0901317はやや上昇した。これら

の薬物添加後24時間後に核タンパクを抽出しゲルシフトをした(図3-b)。OCT配列のみを含むプローブ(-584/-568)では、上部のバンドは、コントロールに比し、9cisRA添加によりDNA結合量が増加した。一方、T0901317ではコントロール同程度であった。OCT1抗体を加えると、上のバンドはやや薄くなることから、上のバンドは、9cisRAを加えたときに検出され、OCT2抗体で消失したことから、OCT2である可能性を示唆する。LPLのmRNAの発現低下とOCT1およびOCT2のDNA結合量の増加は逆相関することが示唆される。

### 【考察】

Octmer transcription factor-1 (OCT1) は、POUドメインをもつ転写因子で、細胞周期、分化、ホルモンシグナル等に関連する遺伝子を調節する。

OCT1は転写アクチベーターとしてだけではな く、転写リプレッサーとしても機能することが 報告されている<sup>1,2)</sup>。POUドメインは、二つの BC11プロモーター

а

ccctgt <u>CTCATGA</u> AT ATGCAAAT caggtgag パリンド <u>OCT配列</u> ローム様 <u>△</u>=2 bp ヘプタマ 一配列

b V1プロモーター

C LPLプロモーター
aata ATTTGCAT gagacaaaaattagaa A

aata ATTTGCAT gagacaaaaattagaa ACTAGT tagag
OCT配列 

□=16 bp パリンドローム配列
図 4

DNA結合ドメインPOU-specific domain (POU<sub>s</sub>) とPOU homeodomain (POU<sub>H</sub>) から成り、両ドメイン間はリンカー DNAで繋がれている $^{3.4}$ )。POU<sub>s</sub>とPOU<sub>H</sub>のシス配列の向きや間隔により、様々なPOUタンパクが、モノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマーを形成し、DNAに結合することを可能とし、リンカー DNA の立体構造が、転写活性化や抑制に関わるコアクチベーターをリクルートし、POUタンパク標的遺伝子の転写が調節されると考えられている。

OCT1は、ユビキタスに発現する転写因子で、RAW細胞にも発現している。OCT1のモノマーの結晶解析によれば、OCTコンセンサス配列(ATTTGCAT)のうち、POU $_{\rm H}$ はATTTに、POU $_{\rm s}$ はGCATに、センス鎖とアンチセンス鎖のDNAを跨ぐ形で結合すると報告されている $^{3}$ 。しかし、ダイマーの結合様式は不明である。

LPL遺 伝 子 は、-582 ATTTGCAT-574という典型的なOCTコンセンサス配列を有するが、-584 bpから-536 bpの領域をみると、**図1**に示すように3つのバンドA・B・Cが検出された。**図** 

1のバンドAは、ATTTGCATに結合し、OCT1 抗体でバンドが減少することから(図3-b)、 OCT1と考えられる。しかし、図1のBとCは、 ATTTGCATではなく、更に下流の領域(下流 のパリンドローム (AACTAGTT)) に結合す る。この二つのバンドB、Cを同定するために、 OCT1抗体でゲルシフトをしたところ、バンドY は消失し、Xは薄くなったことから、いずれのバ ンドもOCT1が結合している可能性が示唆され る (図2-b)。また、Zはバンドの位置やOCT1 抗体に対する反応性から、Xと同一タンパクであ ると考える(図2-c)。Zは、下流のパリンドロ ームのみを含むプローブで検出されるため、Zは、 下流のパリンドローム (AACTAGTT) に結合 すると考える。以上の結果をまとめると、図1の Bは図2のX, Zに相当し、図1のCは図2のYに 相当する。

OCT1は、従来から、OCTコンセンサス配列(ATTTGCAT)に結合することが報告されているが、本研究では下流のパリンドローム配列にも結合することが示された。同様な報告は、

1989年にPoellomgerらが、イムノグロブリン重 鎖遺伝子にも同様のパリンドローム配列構造が 存在し、OCT1とOCT2が結合することを報告 している<sup>5)</sup>。マウスのBC11プロモーターにはオ クタマー配列 (ATGCAAAT) とヘプタマー配 列(CTCATGA)が2bpをはさんでタンデムに 存在する(図4-a)。また、V1プロモーターもオ クタマー配列 (ATGCAAAT) とヘプタマー配 列 (CTAATGA) の間が14bpである (**図4-b**)。 これらの領域にはOCT1、OCT2のいずれも結 合する。興味深いことに、オクタマー配列には OCT1、OCT2がモノマーでしか結合できないが、 オクタマー配列に加えヘプタマー配列存在する と、OCT1・OCT2のヘテロダイマー、OCT1・ OCT1やOCT2・OCT2のホモダイマーが結合し うるということである<sup>5)</sup>。オクタマー配列の近傍 にヘプタマー配列が存在すると、安定した二量体 構造が形成されるのではないかと推察される。

LPLの場合は、オクタマー配列とパリンドローム配列の間が16bpであり、V1プロモーターと近似している(図4-c)。本研究では、オクタマー配列とパリンドローム配列を含むプローブを用いた場合、3つのバンドA・B・Cが検出されたが(図1)、いずれもOCT1抗体に反応したことから、OCT1のモノマー、OCT1・OCT2のヘテロダイマー、OCT1・OCT1のホモダイマーの結合を反映しているのではないかと考える。また、本研究

では、LPLの転写抑制と、核内OCT1、OCT2のオクタマー配列への結合能の増加は逆相関していた(図3-a、b)。OCT1とOCT2の核内局在や、リン酸化等の化学修飾によるDNA結合能の違いが、LPLの転写を制御している可能性がある。更に免疫沈降法等で、DNA結合様式を検討していくつもりである。

- Stephen M, et al.: DNA-dependent conversion of Oct-1 and Oct-2 into transcriptional repressors by Groucho/TLE. Nucleic Acids Res 33: 4618-4625, 2005
- 2. Voleti B, et al.: Oct-1 acts as a transcriptional repressor on the C-reactive protein promoter, Mol Immunol 52: 242-248, 2012
- 3. Ryan AK, et al.: POU domain family values: flexibility, partnerships, abd developmental codes. Genes & Dev 11: 1207-1225, 1997
- Tomilin A, et al.: Synergism with the Coactivator OBF-1 (OCA-B, BOB-1) is mediated by a specific POU dimmer configration. Cell 103: 853-864, 2000
- 5. Poellinger L and Roeder RG: Octmer transcription factors 1 and 2 each bind to two different functional elements in the immunoglobulin heavy-chain promoter. Mol Cell Biol 9: 747-786,1989

### 糖尿病と認知機能-7

### - 糖尿病ラットの認知機能障害のメカニズムについて -

新鄉 明子

### 【要約】

今日では、インスリンは脳内でもつくられるこ とが知られ、脳内に広く存在する受容体を介し て、記憶学習機能に関与することが次第に明らか になってきた1)。このインスリンを介した情報伝 達経路が障害されることにより、認知機能が低下 すると考えられている。我々はこれまでに、グル コーストランスポーターを介してインスリン分泌 を障害するストレプトゾトシン (STZ) を脳室内 に投与して作製した"脳の糖尿病"モデルラット<sup>2)</sup> では認知機能が低下していること、これらのモデ ルラットの脳組織において、特に海馬歯状回堤部 にアミロイドベータタンパクが著明に蓄積してい ること、また、これらの様相を示した海馬体内部 回路の状態は、"脳の糖尿病ラット"の認知機能 の低下には、大脳から海馬歯状回顆粒細胞への情 報入力障害がまず先にあり、それからインスリン 受容体情報伝達経路の機能低下に繋がる可能性が あることなどを、明らかにしてきた。これらを背景に、認知機能低下には、脳海馬内のインスリンの存在量が関与している可能性を探るため、「末梢型」2型糖尿病ラット脳海馬内のインスリン存在量を測定した。

### 【目的】

生後2-3日齢の新生ラットの腹腔内にSTZを 投与して作製した2型糖尿病ラット(DM2T)を 用い、脳海馬に存在するインスリンの量の状態を 検討することを目的とした。

### 【方法】

Wistar系 雄性 ラット2-3日齢の腹腔内に、STZ 80 mg/10 μ1を直接単回投与した。投与後4週後にMorrisの水迷路(MWM)を用い、行動科学的検索を連続10日間行い、認知機能の低下を確認した。コントロールにはSTZの溶解液であるPBSを等量投与したラットを用いた。行動実験後、これらラットの脳から海馬を単離し、

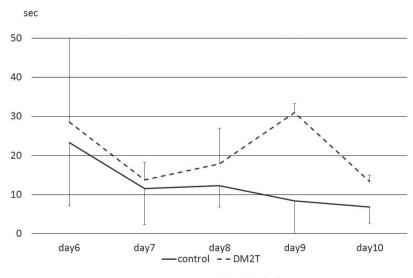
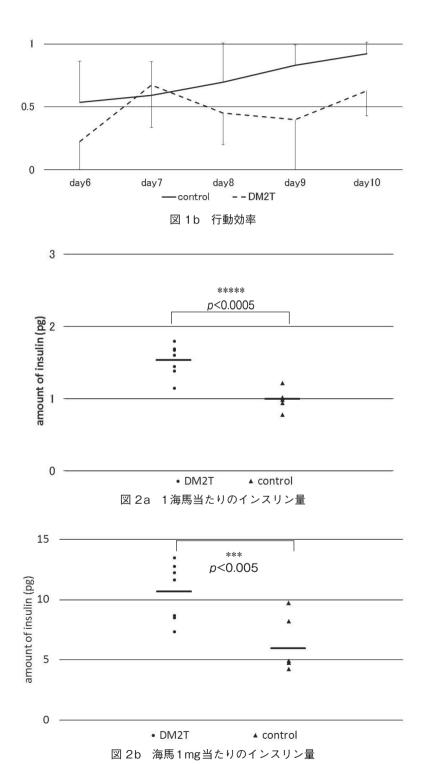


図 1a ゴール到達時間(秒)

1.5



**—** 8 **—** 

Steinerの方法 $^3$ )によって、インスリンを抽出した。測定にはレビス $^8$ インスリン $^-$ ラット(U-Eタイプ)を使用し、全検体はtriplicateでの検出とした。尚、海馬内蔵インスリン量は超微量、且つ、一臓器を一検体では検出感度以下となるため、5臓器(5海馬)を1検体として使用した。解析に用いた試料数は、コントロール群N=5、 $^-$ 2型糖尿病ラットN=5、 $^-$ 25である。なお、用いた動物の血糖値は、DM2T群では250 $^-$ 250 以上を、コントロール群では低いもので145、高いもので190を示した。

### 【結果】

ゴール到達時間については、コントロールは日を追うごとに時間短縮がみられたが、糖尿病ラットについては有意に短縮しているとは認められなかった(図1a)。また、行動達成効率(無駄のない行動を行うほど1に近づく)については、コントロールでは日を追うごとに上昇する一方、糖尿病ラットでは、ゴール達成時間と同様に、有意な上昇は認められなかった(図1b)。尚、コントロール、および糖尿病ラットの水泳速度に差はほとんどなく、また、日を追っての速度変化も認められなかった。

海馬内に存在するインスリンを確認するために 免疫染色を行ったが、検出感度以下であったため、 ELISAによる方法で測定することとした。海馬 ひとつあたりに内蔵されるインスリン量の増加 は、コントロールに比して有意差が認められた。 一臓器当たりでは約1.5倍、1mgあたりでは約2倍 であった(図2a, b)。尚、それぞれの海馬の重量 には差は認められなかった。

### 【考察】

これまでに行っていた"脳の糖尿病"ラットでは、行動学的評価において認知機能が著明に低下しており<sup>4)</sup>、インスリン受容体シグナル伝達経路の一因子である Akt、インスリン分解酵素(IDE)がともに低下しており、アルツハイマー病発症の一因子とされるアミロイドベータタンパク(Ab)の免疫活性が著明に増加していた<sup>4)</sup>ことを明らかにしてきた。これらの現象は、"脳の糖尿病"ラット脳室内にインスリンを投与することによって改善を示した<sup>5)</sup>ことから、脳室内STZ投与由

来における脳の糖尿病状態には、脳内インスリンの量、またはインスリン受容体情報伝達経路が関係すると考えていた。また、大脳嗅内野と海馬体を貫通する貫通線維を介した情報伝達系に異常があるために、大脳から海馬歯状回顆粒細胞への情報入力に障害が生じ、それがインスリン受容体情報伝達経路の機能低下を引き起こし、認知機能障害として現れている可能性を示唆した<sup>6)</sup>。

これらのことから、2型糖尿病における認知機能障害にも、脳内インスリンの存在、またはその量がこれらの現象を引き起こす可能性を検討するため、実験を行った。本実験結果では、2型糖尿病状態のラット脳内インスリンは、むしろ増加しており、インスリン量の低下は見られなかった。しかしながら、2型糖尿病モデルラットの認知機能は、「脳の糖尿病」ラット同様に低下していた。これらのことから、2型糖尿病では、末梢と同様に、脳内でもインスリン抵抗性が存在しており、このことが認知機能の低下に繋がっている可能性があり、と結論した。

- Schechter R, Abboud M: Neuronal synthesized insulin roles on neural differentiation within fetal rat neuron cell cultures. Brain Res 127: 41-49, 2001
- De la Monte SM, Wands JR: Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. J of Diabetes Sci and Technol 2: 1101-1113, 2008
- 3. Steiner DF, Cho S, Oyer PE, Terris S, Peterson JD, Rubenstein AH: Isolation and characterization of proinsulin C-peptide from bovine pancreas. J Biol Chem 246: 1365-1374, 1971
- 4. Shingo AS, Kanabayashi T, Murase T, Kito S: Cognitive decline in STZ-3V rats is largely due to dysfunctional insulin signalling through the dentate gyrus. Behav Brain Res 229: 378-383, 2012
- Shingo AS, Kanabayashi T, Kito S, Murase T: Intracerebroventricular administration of an insulin analogue recovers STZ-induced

cognitive decline in rats. Behav Brain Res 241: 105-111, 2013

6. Shingo AS, Mervis R, Kanebayashi T, Kito S, Muease T: The dendrites of granule cell

layer neurons are the primary injury sites in the "Brain Diabetes" rat. Behav Brain Res 280: 78-83, 2015

# B 研究助成者による研究 (1)血液疾患

# メルファラン投与と同種造血細胞移植関連合併症の 関連についての後方視的研究

内田 直之、谷口 修一

### 【要約】

同種造血細胞移植前処置として繁用されるメル ファラン (Mel) は、強力な抗腫瘍効果と免疫抑 制効果を有する一方、粘膜毒性が強く、下痢や感 染症の原因となる。そこで、Melの至適投与量・ 投与方法を確立するために、後方視的解析を行っ た。64名のMelを使用した対象患者全例で移植 後7日目までにgrade 1以上の下痢症状を認めた。 軽症下痢群 (grade 1-2) と重症下痢群 (grade 3) の2群を比較したところ、Melの投与方法や投与 量との有意な相関は認めなかった。一方移植前の 患者の血清アルブミン値が、下痢重症群で有意に 高い傾向にあった (P=0.02)。Mel 投与量が80-140 mg/m<sup>2</sup>の範囲では、下痢症状はMelよりも患 者側の背景因子の影響がより強いといえる。下痢 軽症群と重症群とで生着率、再発率、非再発死亡 率、全生存率ともに有意差は認めず、現行の低用 量Mel使用は許容可能と考えられた。

### 【目的】

Mel は DNA をアルキル化する抗腫瘍剤で、50年以上にわたって造血細胞移植の前治療として繁用されている。強力な抗腫瘍効果と免疫抑制効果を有する一方、粘膜毒性に代表される非血液毒性を有し、移植後の感染症や GVHD などの合併症の誘因となる<sup>1)</sup>。 Mel は血液中で加水分解されるが、移植前の臓器障害と代謝との関連は十分解明されておらず、腎機能障害と Mel のクリアランスとの関連についても一定していない<sup>2,3)</sup>。 我々は当院で Mel を含む移植前治療を用いた同種造血細胞移植患者において、 Mel の投与量や投与方法と最も頻度の多い毒性である下痢症状との関連を後

方視的に検討し、Melの至適な投与量・投与方法を検討する<sup>4)</sup>。

### 【方法】

2015年1月~2015年12月の間に当院でMelを含む移植前治療を用いて初回の同種造血細胞移植を実施した患者を対象とし、診療記録を後方視的に検討した。移植時ECOG PS 4以上、活動性感染症を有する、重篤な臓器障害(LVEF<50%、T.bil>3、室内気でSpO<sub>2</sub><90%、Cr>2)を有する患者を除外した。

#### 【結果】

64名が対象となった。41名が男性、年齢中央値56.5(範囲21~73)歳、急性骨髄性白血病が44名と最も多く、その他骨髄異形成症候群、悪性リンパ腫等を含み、疾患病期は高リスク例が約7割であった。ドナーは血縁末梢血が3名、非血縁骨髄が12名、臍帯血が49名であった。Mel使用量は80mg/m²が61名、120mg/m²が2名、140mg/m²が1名で、ワンショット静注(Iv)が39名、点滴静注(Div)が25名であった(表1)。

移植後7日目までに64名全例で下痢症状を認め、NCI-CTCAEv4.0のgrade 1が10名、2が15名、3が39名であった。Grade  $1\cdot2$ を軽症下痢群、grade 3を重症下痢群として比較したところ、両群間でMel総投与量(体表面積1m $^2$ 当たり、体重1kg当たり、全体重当たり)、投与方法(Iv vs. Div)は、偏りを認めなかった( $\mathbf{表2}$ )。年齢、血清総タンパク値、血清アルブミン値、血清クレアチニン値、ヘマトクリット値について検討したところ、重症下痢群で血清アルブミン値が有意に高かった。

### 表 1 患者背景

対象となった64名の背景因子。(AML, acute myeloid leukemia; MDS EB2, myelodysplastic syndrome excess blast 2; CML, chronic myeloid leukemia; MPN, myeloproliferative neoplasm; ML, malignant lymphoma; ATL, adult T-cell leukemia; ALL, acute lymphoblastic leukemia; BM, bone marrow; HCT-CI, hematopoietic cell transplantation comorbidity index; RPB, related peripheral blood; UBM, unrelated bone marrow; CB, cord blood; Flu, fludarabine; Mel, melphalan; ivBu, intravenous busulfan; TBI, total body irradiation; CI, calcineurin inhibitor; MTX, methotrexate; MMF, mycophenolate mofetil; ATG, anti-thymocyte globulin)

Characteristic	Values
N	64
Median age, y (range)	56.5 (21 – 73)
Sex, no. (%)	
Male	41 (64)
Female	23 (36)
Disease diagnosis, no. (%)	
AML	44 (69)
MDS EB2	4 (6)
CML	4 (6)
MPN	2 (3)
ML	6 (9)
ATL	2 (3)
ALL	1 (2)
Disease status at transplantation, no. (%)	
BM blasts <5%	20 (31)
≥5%	44 (69)
Performance status	
0	10 (16)
1	48 (75)
2	6 (9)
HCT-CI score, no. (%)	(2-)
0	17 (27)
1	2 (3)
2	20 (31)
3	17 (27)
4	1 (2)
5	6 (9)
Banar share staristics, no. (9/)	1 (2)
Donor characteristics, no. (%) RPB	3 (5)
UBM	12 (19)
	49 (77)
CB Pretransplant conditioning	49 (77)
Flu+Mel+ivBu	54 (84%)
Flu+Mel+TBI	10 (16%)
Total Mel (mg/m²)	10 (10 %)
80	61 (95%)
120 – 140	3 (5%)
Mel administration	3 (3 /0)
iv only	39 (61 %)
div +/- iv	25 (39%)
GVHD prophylaxis	23 (39 %)
CI	
CsA-based	2 (3%)
Tac-based	62 (97%)
Drugs used in combination with CI	<u> </u>
MTX	13 (20%)
MMF	43 (67%)
ATG	5 (8%)
none	8 (13%)
	3 (.070)

表 2 下痢症状の重症度と影響した因子 (Alb, serum albumin; TP, total protein; Hct, hematocrit; Cr, creatinine)

Variables			P
	grade 1-2	grade 3	
N	25	39	
Diarrhea grade			
1	10		
2	15		
3		39	
Conditioning			
Melphalan			
dose/m <sup>2</sup>	80 (80 – 140)	80 (80 – 120)	n.s.
dose/kg	2.32 (1.96 – 3.83)	2.32 (1.55 – 3.48)	n.s.
dose/body	135 (110 – 210)	130 (100 – 195)	n.s.
via div	11	14	n.s.
Age (year)			
<55	13	18	n.s.
≥55	12	21	
Alb (g/dl)			
<3.5	16	13	0.022
≥3.5	9	26	
TP (g/dl)			
<6.6	13	17	n.s.
≥6.6	12	22	
Hct (%)			
<23.7	14	18	n.s.
≥23.7	11	21	
Cr (mg/dl)			
≤0.7	16	19	n.s.
>0.7	9	20	

軽症下痢群、重症下痢群とで生着率、累積急性 GVHD発症率、累積非再発死亡率、累積再発率、 全生存率は有意差がなかった(図1)。

### 【考察・結論】

Mel投与量や投与方法の下痢症状の重症度への有意な影響は認めなかった。一方で血清アルブミン値が有意に影響していた。移植後の下痢症状は、Melだけでなく、移植前の患者側の因子が重要であると考えられた。今後、より高用量のMel投与例を含め、薬物動態を併せて検討する予定である。

- Bayraktar UD, Bashir Q, Qazilbash M, et al.: Fifty years of melphalan use in hematopoietic stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 19: 344-356, 2013
- 2. TricotTricot G, Alberts DS, Johnson C, et al.: Safety of autotransplants with high-dose melphalan in renal failure: a pharmacokinetic and toxicity study. Clin Cancer Res 2: 947-952, 1996

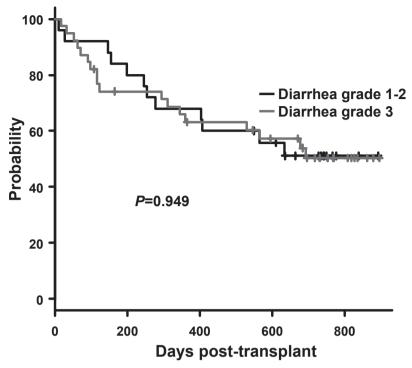


図 1 下痢重症度群別全生存率 下痢重症度 grade 1-2群と grade 3群との間で全生存率に有意差は認めなかった。

- 3. Nath CE, Shaw PJ, Trotman J, et al.: Population pharmacokinetics of melphalan in patients with multiple myeloma undergoing high dose therapy. Br J Clin Pharmacol 69: 484-497, 2010
- 4. 橋本湖澄, 松本加奈, 内田直之, 他: 同種造血 幹細胞移植の前処置で用いられるメルファ ランの体内動態の評価とその変動要因の検 討. 医療薬学フォーラム (2016) (大津)

同種造血細胞移植後の類洞閉塞症候群/肝中心静脈閉塞症 (SOS/VOD) に対するトロンボモデュリン アルファ (遺伝 子組換え) の安全性と有効性についての後方視的検討

> 高木 伸介、谷口 修一、伊豆津 宏二、内田 直之 森 有紀、山本 豪、山本 久史、石綿 一哉 西田 彩、景山 康生、湯淺 光博

### 【背景】

類洞閉塞症候群/肝中心静脈閉塞症(SOS/VOD)は同種造血細胞移植後に起こる合併症のうち特に致死率の高い難治性合併症である。標準的な治療薬はデフィブロタイドだが、本邦では未承認であることに加え、重症例での寛解率は30%程度に留まる。播種性血管内凝固(DIC)に対する治療薬であるトロンボモデュリンアルファ(遺伝子組換え)(RhTM)は、これまで複数の症例報告でSOS/VODに対する有効性が示唆されているが、科学的な根拠は乏しい<sup>1-4)</sup>。

### 【目的】

SOS/VODに対するRhTMの安全性と有効性 について明らかにする。

### 【方法】

2011年1月から2016年3月の間に虎の門病院で同種造血細胞移植を行った症例を対象とした。SOS/VODは2016年に発表された新EBMT基準で後方視的に診断した<sup>5)</sup>。DICに対してRhTMを使用した症例のうち、SOS/VODを併発した症例を抽出し解析した。移植前処置開始時に総ビリルビン 2 mg/dL以上を有する症例、腹水を有する

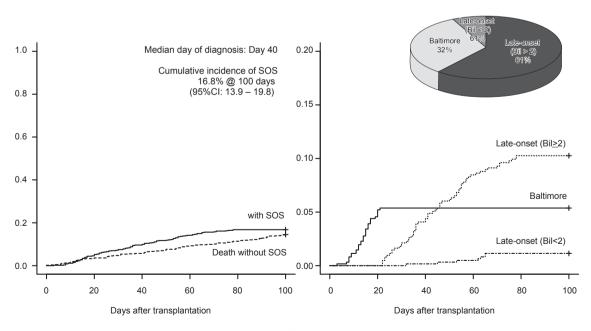


図 1

症例、performance status (PS) 3または4の症 例は解析から除外した。

### 【結果】

研究期間に682回の同種造血細胞移植が行われており、除外基準に従い614例について解析した。103例がSOS/VODを発症し、その発症中央日は移植後40日目(範囲3-78)だった。移植後100日目までのSOS/VOD累積発症率は16.8%(95%信頼区間13.9-19.8)だった。診断の内訳は、late onset SOS/VOD(Bil  $\geq 2$ )が61%と最多を占め、Baltimore criteriaを満たすものが32%、late onset SOS/VOD (Bil < 2)が7%と続いた(図1)。SOS/VODの発症危険因子について、年齢、PS、病期、過去の移植歴、前処置強度、ブスルファンの使用、ドナー細胞の種類について検討し

た。その結果、多変量解析で、ブスルファンの使用 (p<0.001)、過去の移植歴 (p<0.001)、臍帯 血の使用 (p=0.01) が危険因子として抽出された (表1)。SOS/VOD発症例の移植後1500日時点での全生存率は11.7%で、非発症例の41.9%に比べて有意に低かった (p<0.001)。また、late onset SOS/VOD (Bil <2) の全生存率はSOS/VOD非発症例と同等だったが、それ以外の二病型の全生存率は有意に低かった (p<0.001) (図2)。

SOS/VOD 103例のうち、RhTMを使用していた症例が77例あった。RhTMの投与日数が3日以内の症例、SOS/VODの最初の症状が出現する2週間以内にRhTMを使用した症例、最初の症状が出現して30日以上経過してRhTMを使用した症例を除外し、評価可能な61例について解析し

表 1

Risk fa	ector	N	Univaria	Multivariate			
Age	≥ 53 vs. < 53	324 vs. 290	18.8% vs. 14.5%	p = 0.152	_	_	_
Performance status	2 vs. 0/1	95 vs. 519	16.8% vs. 16.8%	p = 0.931	_	_	_
Disease status	not in CR vs. in CR	458 vs. 156	19.7% vs. 8.3%	p = 0.000855	HR 1.90	1.05 - 3.43 p	= 0.033
Previous HCT	≥ second vs. first	129 vs. 485	25.6% vs. 14.4%	p = 0.00205	HR 2.02	1.33 - 3.08 p	= 0.00096
Conditioning intensity	MAC vs. RIC	477 vs. 137	16.8% vs. 16.8%	p = 0.848	_	_	_
Busulfan	yes vs. no	381 vs. 233	21.5% vs. 9.0%	p = 0.000103	HR 2.38	1.41 – 3.90 p	= 0.0011

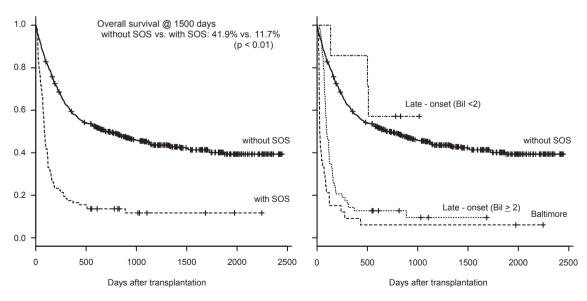


図 2

た。RhTM開始の中央日は移植後34日目(範囲4-89)、RhTM投与期間の中央値は6日間(範囲4-41)だった。61例中36例(59.0%)がRhTM単剤療法、それ以外の症例がダルテパリン、アンチトロンビンⅢ、またはプロスタグランジンE1との併用療法を行っていた。61例中55例(90.2%)がプレドニゾロン換算で0.5mg/kg以上のステロイド剤を併用していた。移植後1年時点でのSOS/VOD寛解率は29.5%(95%信頼区間18.3-41.6)だった。

今回解析したSOS/VOD 症例では、治療経過中

に特発性肺炎症候群を併発して早期死亡した症例が多く含まれていた。それらを除外して、RhTM使用例(47例)と非使用例(21例)でSOS/VOD寛解率、全生存率を比較した。その結果、RhTM使用例の移植後1年時点でのSOS/VOD寛解率は36.2%で、非使用例の23.8%に比べて有意差は認めなかった(p=0.359)。移植後900日時点での全生存率はRhTM使用例で良い傾向があった(23.4% vs. 7.1%, p=0.0962)(図3)。

安全性については、RhTM使用開始2週間以内に33症例46イベントの出血性合併症を認めた。

表 2

Within 2 weeks after RhTM use	G1	G2	G3	G4	G5	Total
Oral	2	4	1			7
Gastro-intestinal	1	4	1	2	1	9
Intra-abdominal					1	1
Intra-cranial				1	2	3
Hematuria	4	1				5
Epistaxis	2	4	2			8
Broncho-pulmonary	1				3	4
Purpura	9					9
Total	19	13	4	3	7	46 AEs/33 pts

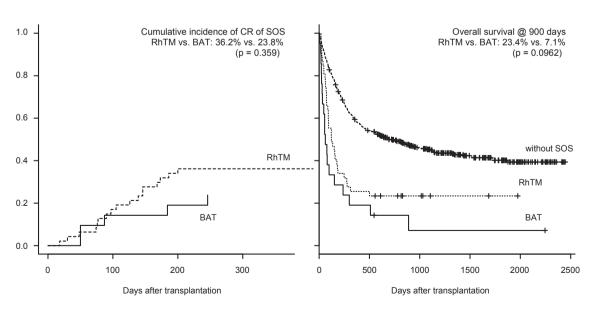


図 3

そのうち、grade 5の出血性合併症を6症例7イベント認めた(**表2**)。

### 【考察】

本研究においてlate onset SOS/VODの発症頻度が高かったことが従来の報告と異なる点だった。これについては、移植前処置でブスルファンとメルファランを併用した場合にlate onset SOS/VODの頻度が増えるという自家移植での報告があるが、本研究でもこの前処置薬の組み合わせが影響している可能性があると考えられた<sup>6.7)</sup>。SOS/VODに対するRhTMの一定の有効性が示唆されたが、安全性については慎重な検討が必要である。

- Ikezoe T, Togitani K, Komatsu N, Isaka M, Yokoyama A: Successful treatment of sinusoidal obstructive syndrome after hematopoietic stem cell transplantation with recombinant human soluble thrombomodulin. Bone Marrow Transplant 45: 783-785, 2010
- 2. Ohwada C, Takeuchi M, Kawaguchi T, et al.: Successful treatment with recombinant soluble thrombomodulin of two cases of sinusoidal obstructive syndrome/hepatic veno-occlusive disease after bone marrow transplantation. Am J Hematol 86: 886-888, 2011
- Nakamura D, Yoshimitsu M, Kawada H, et al.: Recombinant human soluble thrombomodulin for the treatment of hepatic sinu-

- soidal obstructive syndrome post allogeneic hematopoietic SCT. Bone Marrow Transplant 47: 463-464, 2012
- 4. Yamamoto S, Matsuno R, Sugishita Y, et al.: Sinusoidal obstructive syndrome prophylaxis with recombinant human soluble thrombomodulin is feasible in gemtuzumab ozogamicin-treated patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation. Bone Marrow Transplant 52: 1068-1070, 2017
- 5. Mohty M, Malard F, Abecassis M, et al.:
  Revised diagnosis and severity criteria for
  sinusoidal obstruction syndrome/venoocclusive disease in adult patients: a new
  classification from the European Society for
  Blood and Marrow Transplantation. Bone
  Marrow Transplant 51: 906-912, 2016
- 6. Lee JL, Gooley T, Bensinger W, Schiffman K, McDonald GB.: Veno-occlusive disease of the liver after busulfan, melphalan, and thiotepa conditioning therapy: incidence, risk factors, and outcome. Biol Blood Marrow Transplant 5: 306-315, 1999
- Carreras E, Rosinol L, Terol MJ, et al.: Veno-occlusive disease of the liver after highdose cytoreductive therapy with busulfan and melphalan for autologous blood stem cell transplantation in multiple myeloma patients. Biol Blood Marrow Transplant 13: 1448-1454, 2007

## FLT3/ITD遺伝子変異陽性急性骨髄性白血病に対する 同種造血幹細胞移植の検討

西田 彩

### 【要約】

FMS-like tyrosine kinase 3/internal tandem duplication (FLT3/ITD) 遺伝子変異は急性骨髄生白血病 (AML) 患者の約30%で見られる。FLT3-ITD変異陽性急性骨髄性白血病 (FLT3-ITD AML) は予後不良であり、主に第一寛解期での同種造血幹細胞移植によって治療成績の向上が得られるとされている。しかしながら、FLT3-ITD AML患者に対する同種造血幹細胞移植の既報告によると、第一寛解期であっても高い再発率(31-63%)と低い生存率 (38-54%)が問題となっている<sup>1-5)</sup>。一方、非寛解期症例での同種移植成績の報告はほとんど無いのが現状である。今回、非寛解期のFLT3-ITD AMLに対する臍帯血移植 (CBT) の有効性および臨床像について後方視的に検討を行ったので報告する。

### 【目的】

非寛解期のFLT3-ITD AMLに対するCBTの 有効性、臨床像を検討する。

### 【方法】

虎の門病院で2011年1月から2016年3月にAMLに対して初回CBTを施行された276例のうち、115例において移植前に少なくとも1回FLT3-ITD遺伝子変異検査が行われた。29例でFLT3-ITD陽性であり、そのうち非寛解でCBTを施行された26例を対象として後方視的検討を行った。

### 【結果】

患者背景を**表1**に示す。移植時年齢中央値は60歳(19-69)、男性19例、女性7例。26例のうちMDS由来AMLが8例含まれていた。染色体検査は正常核型11例、複雑核型4例、その他11例で、

表 1 患者背景 (n=26)

Median Age (yr)	60 (19-69)
Sex (male / female)	19/7
Diagnosis	
de novo AML/ AML followed by MDS/ t-AML	16/8/2
Cytogenetics at HSCT	
normal / complex / others	11/4/11
Disease status at HSCT	
chemo naïve/ PIF/ rel 1	7/ 7/ 12
Conditioning regimen (MA/ RIST 25/1)	
Flu+Mel+Bu	24
Flu+Bu+TBI	1
Flu+Mel+TBI	1
GVHD prophylaxis	
FK	7
FK+MMF	19

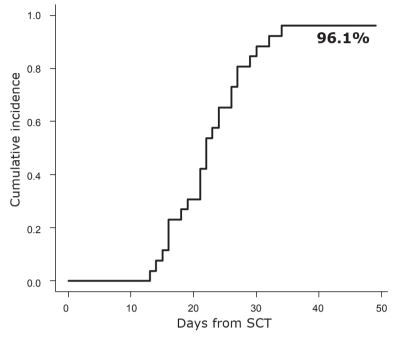
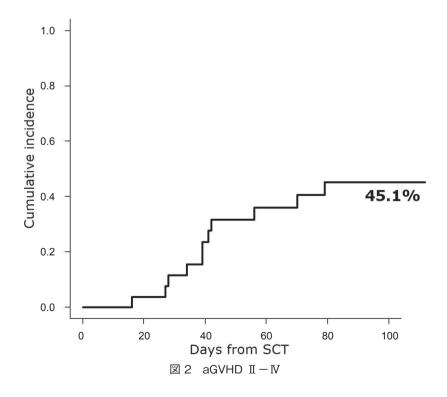


図 1 Neutrophil Engraftment



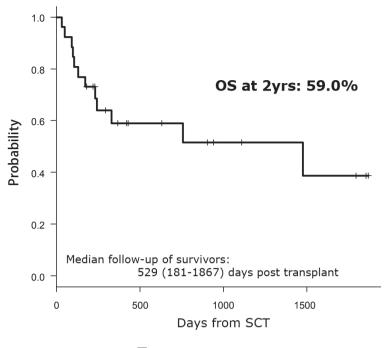


図 3 Overall Survival

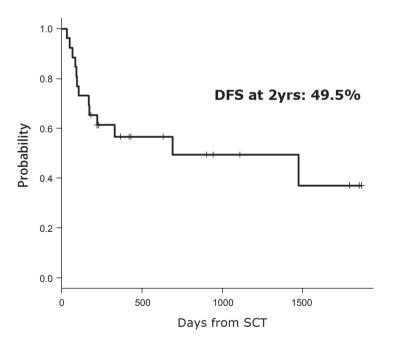


図 4 Disease Free Survival

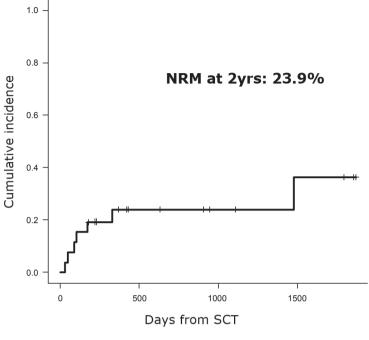


図 5 Non Relapse Mortality

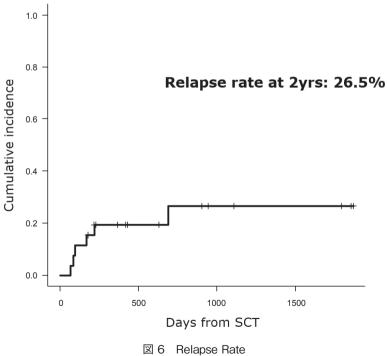


表 2 Analysis of factors associated with OS

Variable	-	n	Univariate	analysis	Multiivariate analysis		
vai iabi <del>c</del>		n	OS at 2yrs	P value	HR (95% CI)	P value	
Age	< 60	12	80.2%	0.062			
	≧60	14	42.9%				
Diagnosis	de novo AML	16	81.2%	0.010	2.496 (0.656-9.499)	0.18	
	AML with MRC and t-AML	10	30.0%				
Cytogenetics	normal	11	60.6%	0.018	0.778 (0.375-1.616)	0.50	
	complex	4	25.0%				
	others	11	72.7%				
aGVHD	+	15	78.8%	0.008	0.264 (0.062-1.122)	0.07	
	_	11	32.7%				
MMF	+	19	49.7%	0.137			
	_	7	66.7%				
PIR	mild	15	56.0%	0.636			
	severe	10	70.0%				
Time from	< 180 days	13	61.7%	0.418			
AML Dx to CBT	≥ 180 days	13	53.8%				

移植時の病期はchemo naïve 7例、寛解導入不 応7例、再発期12例であった。24例がFlu/Mel/ Bu、1例がFlu/Bu/TBI、1例がFlu/Mel/TBIの 前処置を用いて移植を施行され、GVHD予防は7 例がFK単独、19例がFK+MMFで行われた。生 存者の観察日数中央値は529(181-1867)日であ った。好中球生着は96.1%で達成された(図1)。 aGVHD grade Ⅱ-Ⅳ発症率は45.1%であった (**図2**)。2年全生存率 (OS) 59.0% (95%CI 36.8-75.7) (図3)、無増悪生存期間 (PFS) 49.5% (95% CI 27.2-68.4)(図4)、非再発死亡率23.9%(図5)、 再発率26.5% (図6) であった。OSに寄与する 因子の単変量解析ではMDS由来AML、複雑核 型、aGVHD無しが予後不良因子となったが、多 変量解析では独立した予後因子は認めなかった (表2)。

### 【考察】

非寛解期のFLT3-ITD AML対するCBTの成績は、OS 59.0%、PFS 49.5%と良好であった。 速やかなドナー確保が可能であるCBTは非寛解期のFLT3-ITD AMLに対する有効な治療戦略 となり得る。

- Gale RE, et al.: No evidence that FLT3 status should be considered as an indicator fortransplantation in acute myeloid leukemia (AML): an analysis of 1135 patients, excluding acute promyelocytic leukemia, from the UK MRCAML10 and 12 trials. Blood 106: 3658-3665, 2005
- Sengsayadeth SM, et al.: Allo-SCT for highrisk AML-CR1 in the molecular era: impact of FLT3/ITD outweighs the conventional markers. Bone Marrow Transplantation 47: 1535-1537, 2012
- 3. Brunet S, et al.: Impact of FLT3 Internal Tandem Duplication on the Outcome of Related and Unrelated Hematopoietic Transplantation for Adult Acute Myeloid Leukemia in First Remission: A Retrospective Analysis. J Clin Oncol 30: 735-741, 2012
- 4. Schmid C, et al.: Outcome of patients with

- distinct molecular genotypes and cytogenetically normal AML after allogeneic transplantation. Blood 126: 2062-2069, 2015
- 5. Song Y, et al.: FLT3 mutational status is an independent risk factor for adverse outcomes after allogeneic transplantation in AML. Bone Marrow Transplantation 51: 511-520, 2016
- 6. Deol A, et al.: Does FLT3 Mutation Impact Survival After Hematopoietic Stem Cell

Transplantation for Acute Myeloid Leukemia? A Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR) Analysis. Cancer 122: 3005-3014, 2016

### 【発表に関する事項】

 西田彩 他: Cord blood transplantation for FLT3-mutated acute myeloid leukemia in non-remission status. 第39回日本造血細胞移 植学会(島根)

### 造血幹細胞移植を受けた患者のQOLに関する縦断的調査研究

森 有紀、景山 康生、湯浅 光博、西田 彩 石綿 一哉、高木 伸介、山本 久史、山本 豪 内田 直之、伊豆津 宏二、谷口 修一

### 【要約】

近年、造血幹細胞移植後の長期生存者数の増加に伴い、血液疾患の治癒のみならず、精神的・身体的満足度や機能状態を含めた総合的な生活の質(QOL)の向上が求められている。既に、移植片対宿主病(GVHD)とQOLの関係が報告されているが、その他も様々要因が関与していると予測される。本研究では、移植後患者におけるQOLを経時的に評価することで、新たに、年齢が移植後のQOLに影響を及ぼす可能性があることが明らかとなった。若年者では、高齢者に比較して、身体的或いは役割/社会的側面のスコアが高いものの、精神的満足度が低い結果が得られ、年齢に応じた移植後長期フォローアップ(LTFU)介入の必要性が示唆された。

### 【目的】

本研究は、移植後患者のQOLを経時的に評価すると共に、QOLに影響を与える因子を明らかにし、適切な介入を行うことで、移植後患者のQOLを改善させることを目的とした。

### 【方法】

2010年4月~2016年6月に当院で第1回目の同種造血幹細胞移植を受けた患者を対象に、移植後半年、1年、1年半、2年以降1年毎に、2種類の自己記入式質問紙票(MOS 36-Item Short-Form Health Survey(SF-36)とFunctional Assessment of Cancer Therapy-Bone Marrow Transplantation(FACT-BMT))を用いて、QOLに関する前方視的調査を実施した。QOLスコアを算出し、t検定及び一元配置分散分析を用いて、年齢、性別、移植ソース間で比較を行った。

#### 【結果】

計2回以上調査に参加した304例より計1264通 の質問紙表を回収し、解析を実施した。年齢の

中央値は53才(16-70)才で、男性が60%、臍 帯血移植が60%、非血縁者間骨髄移植が28%、 血縁者間移植が12%であった。性別について は、移植後1年では、FACT-BMTのSocial/ family well-being Scoreが女性で(18.8 vs. 20.5. P=0.02)、SF-36の身体的サマリースコア (Physical Component Summary: PCS) が男性 で (46.0 vs. 42.2, P=0.006) 有意に高かったが、 移植後2年では男女間でQOLスコアに有意差を 認めなかった。移植ソースについては、移植後1 年及び2年共に、3者間でQOLスコアに有意差を 認めなかった。一方、年齢に関しては、40才以 下、41オ~60才、61才以上の3群に分けてQOL スコアを比較したところ、SF-36のPCS、役割/ 社会的サマリースコア (Role/social Component Summary: RCS)、精神的サマリースコア (Mental Component Summary: MCS) で有意差を認めた (図1、表1)。移植後1年のPCSは40才以下で最 も高く、年齢と共に低くなった (Age<40 49.0  $\pm 9.6$ ,  $40 \le Age \le 60$   $43.8 \pm 11.0$ ,  $60 \le Age 41.3$ ± 13.0, P=0.013) (図1)。RCSも同様の傾向が 見られた (Age<40 46.0 ± 11.5, 40≤Age<60  $43.5 \pm 14.5$ ,  $60 \le \text{Age } 39.3 \pm 16.6$ , P = 0.035). 方、MCSは、40才以下で最も低く、年齢と共 に高くなる傾向が見られた(Age<40 51.7 ±  $10.1, 40 \le Age < 60 54.5 \pm 8.9, 60 \le Age 57.5 \pm$ 9.6, P<0.01)。これら3つのサマリースコアにつ いては、移植後2年も同様の傾向が見られた。一 方、FACT-BMTでは、移植後1年のFunctional well-being Score が若年で高い傾向が見られたが  $(Age < 40 \ 19.9 \pm 5.6, \ 40 \le Age < 60 \ 18.3 \pm 5.8, \ 60)$ ≤Age 17.5 ± 6.4, P=0.038)、移植後2年での有意 差は認められず、またその他のスコアについては 年齢による明らかな違いを認めなかった(表1)。

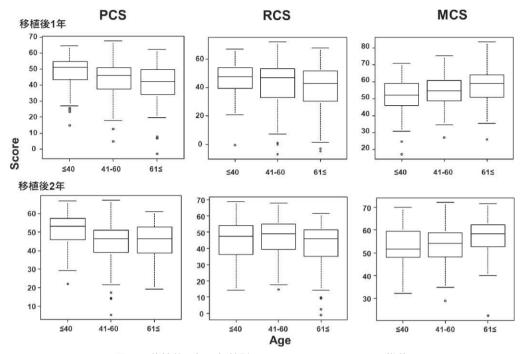


図 1 移植後1年の年齢別のSF36サマリースコアの推移

表 1 移植後1年及び2年の年齢別のQOLスコア

At 1 year aft	er HSCT	≤40	41-60	61≤	P-value
FACT-BMT	FACT-G total	79.4	78.1	77.6	0.74
	FACT trial outcome index (TOI)	79.4	78	80.0	0.05
	FACT-BMT total	106.4	104.3	103.1	0.57
	Physical well-being (PWB)	22.4	22.2	21.8	0.73
,	Social/family well-being (SWB)	19.8	19.1	19.8	0.65
	Emotional well-being (EWB)	17.4	18.5	18.5	0.10
	Functional well-being (FWB)	19.9	18.3	17.5	0.038
	BMT subscale (BMTS)	26.9	26.2	25.5	0.22
SF-36	Physical component summary (PCS)	49.0	43.8	41.3	0.013
	Mental component summary (MCS)	51.7	54.5	57.5	<0.01
	Role/Social component summary (RCS)	46.0	43.5	39.3	0.035
At 2 years a	fter HSCT	≤40	41-60	61≤	P-value
FACT-BMT	FACT-G total	82.0	78.1	80.1	0.30
	FACT trial outcome index (TOI)	73.2	68.1	69.4	0.09
	FACT-BMT total	110.5	104.5	106.9	0.18
	Physical well-being (PWB)	24.1	22.8	23.6	0.18
	Social/family well-being (SWB)	19.0	18.2	18.4	0.75
	Emotional well-being (EWB)	18.3	18.2	19.1	0.27
	Functional well-being (FWB)	20.6	18.8	19.0	0.19
	BMT subscale (BMTS)	28.5	26.5	26.8	0.09
SF-36	Physical component summary (PCS)	50.8	44.4	45.3	<0.01
	Mental component summary (MCS)	53.4	53.1	57.3	<0.01
	Role/Social component summary (RCS)	46.4	46.1	41.4	0.035

### 【考察】

現在までに欧米で実施された移植後患者の QOLに関する大規模縦断研究によって、移植後 の経過日数とともにQOLの改善が期待できるこ とや、慢性GVHDの合併がQOLの低下に関与す ることが報告されている<sup>1-3)</sup>。QOLの評価につ いては、遺伝的相違や社会的背景なども強い影響 を与えることから、欧米のデータをそのまま日本 のQOLに当てはめることは出来ないが、本邦で もほぼ同じような結果が得られている<sup>4)</sup>。本研究 では、GVHD以外の比較的一般的な要因の影響 について解析を行ったところ、性別及び移植ソー ス間では、QOLスコアは明らかな差を認めない ものの、年齢については、QOLスコアに差が出 る結果が得られた。若年層では、高齢者に比べて、 身体的及び役割・社会的側面のQOLが良好であ る一方、精神的な満足度が低い傾向にあること が明らかとなった。QOLは主観的な評価であり、 医療者側が医学的側面から評価した結果とは異な る可能性は十分に考えられる5)。若年層は、身体 的な回復度は高齢者と比較して良好かつ速やかで あるものの、既に家庭や職場で一定の立ち位置が 確立されている中高年層や高齢者と比較して、将 来に繋がる様々な転帰に直面することがあり、血 液疾患及び移植治療が、就職、結婚、出産などの 岐路における決断に大きな影響を与える可能性が 十分に予想される。この点で、自らが思い描いて いた状況と現状とのギャップが、精神的満足度の 低下の一端を担っていると考えられる。従って、

若年層は、医学的な回復が速やかな場合が多いため、移植後比較的早い時期より外来頻度や看護ケアの密度もとかく減少しがちだが、精神面の長期フォローアップ及び継続的な援助が不可欠であり、医療サイドからの積極的な介入が必要だと考えられた。

- Pidala J, Anasetti C, Heather Jim: Quality of life after allogeneic hematopoietic cell transplantation. Blood 114: 7-19, 2009
- 2. Andrykowski MA, Bishop MM, Hahn EA, et al.: Long-term health-related quality of life, growth, and spiritual well-being after hematopoietic stem-cell transplantation. J Clin Oncol 23: 599-608, 2005
- Lee SJ, Kim HT, Ho VT, et al.: Quality of life associated with acute and chronic graftversus-host disease. Bone Marrow Transplant 38: 305-310, 2006
- 4. Yano K, Kanie T, Okamoto S, et al.: Quality of life in adult patients after stem cell transplantation. Int J Hematol 71: 283-289, 2000
- Kurosawa S, Oshima K, Yamaguchi T, et al.: Quality of Life after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation According to Affected Organ and Severity of Chronic Graft-versus-Host Disease. Biol Blood Marrow Transplant 23: 1749-1758, 2017

### 造血幹細胞移植後のBKV感染症に関する研究

湯淺 光博、景山 康生、西田 彩、石綿 一哉、 高木 伸介、山本 久史、山本 豪、森 有紀、 内田 直之、伊豆津 宏二、谷口 修一

### 【要約】

2010年から2016年までに当院で施行された同 種移植症例の内、移植後に何らかの神経症状を有 し髄液検査を施行した症例133名を対象とし、後 方視的にBKV感染症を解析した。BKV陽性例 は9名で、その他ADV、CMV、EBV、HHV6、 HHV7、JCV、VZVがそれぞれ2名、8名、6名、 56名、2名、2名、1名で陽性となった。MRIで異 常信号を認めた3名の髄液BKV量は777.17600. 49700 copies/mlと高値であり、Cidofovir投与を 行うも意識障害は急速に進行し、BKV検出後早 期に死亡した。意識障害が軽度またはみられない 3症例では、髄液BKV量は89, 130, 466 copies/ mlであり、2名は無治療で生存、1名は肺胞出血 で死亡した。脳出血に伴う陽転化が疑われる症例 が2名みられた。髄液中のBKV陽転化は、他の 複数のウイルスの混合感染を高頻度に伴い、ホス トの免疫不全状態の反映と考えられた。一方、頭 部MRI検査で異常信号の出現者ではBKVのウイ ルス量高値である傾向があり、BKVそのものに よる脳炎の可能性が示唆された。全例急速に意識 障害が進行し、鑑別すべき病態と考えられた。

### 【目的】

BKVは臓器移植後に出血性膀胱炎、尿細管間質性腎炎を起こす原因ウイルスとして知られているが、脳炎・肺炎などの致死的感染症を稀におこすとされている。しかしながら、造血幹細胞移植後のBKVに関連する中枢神経合併症の報告は限られており<sup>1,2)</sup>、臨床像や予後、病的意義は不明である。当院での症例を検討する事によりこれらの点を明らかにする事を目的とする。

### 【方法】

2010年から2016年までに当院で施行された同

種移植症例の内、移植後に何らかの神経症状を有し、マルチプレックスPCR検査(HSV1, HSV2, VZV, CMV, HHV6, HHV7, HHV8, BKV, JCV, EBV, ParvoB19, ADV)を含めた髄液検査を施行した症例133名を対象とし、後方視的にBKV感染症を解析した。

### 【結果】

BKV陽性例は9名で、その他ADV、CMV、 EBV、HHV6、HHV7、JCV、VZVがそれぞれ2名、 8名、6名、56名、2名、2名、1名で陽性となっ た。髄液BKV陽性例の年齢中央値は45歳(33-71 歳)で、原疾患はAML 6名、ALL 2名、FL 1名 であった。6名は移植歴があった。BKV検出の移 植後中央値は44日 (8-173)、髄液中のBKV量 の中央値は503 (13-46700) copies/mlであった。 髄液細胞数、リンパ球数、蛋白の中央値はそれぞ  $1.24.5 (0-318)/\mu I$ , 15  $(0-305)/\mu I$ , 118 (20-1380) mg/dlであった。髄液 BKV 単独検出は3名で、 他の6名は他のウイルスとの混合感染であった。 BKV ウイルス血症は6名、5名で出血性膀胱炎を 合併していた。頭部MRIを撮影した7名中2名で 両側白質脳症、1名で両側大脳半球、橋に小斑状 の高信号域がみられた。MRIで異常信号を認め た3名の髄液BKV量は777, 17600, 49700 copies/ mlと高値であり、Cidofovir投与を行うも意識障 害は急速に進行し、BKV検出後早期に死亡した。 意識障害が軽度またはみられない3症例では、髄 液BKV量は89,130,466 copies/mlであり、2名 は無治療で生存、1名は肺胞出血で死亡した。脳 出血に伴う陽転化が疑われる症例が2名みられ た。

### 【考察】

髄液中のBKV陽転化は、他の複数のウイルス

の混合感染を高頻度に伴い、ホストの免疫不全状態の反映と考えられた。一方、頭部MRI検査で異常信号の出現者ではBKVのウイルス量高値である傾向があり、BKVそのものによる脳炎の可能性が示唆された。全例急速に意識障害が進行し、鑑別すべき病態と考えられた。BKV脳炎は致死的感染症であり有症状となった場合に救命できる確率は極めて低く、発症リスク因子の同定を今後検討していきたい。

### 【文献】

 Behre G, et al.: BK virus encephalitis in an allogeneic hematopoietic stem cell recipient. Bone Marrow Transplant 42: 499, 2008 2. Lee SY, et al.: BK virus encephalitis without concurrent hemorrhagic cystitis in an allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipient. Blood Res 48: 226-228, 2013

### 【発表に関する事項】

湯淺 光博、山本 久史、山口 享祐、景山 康生、西田 彩、石綿 一哉、高木 伸介、 森 有紀、内田 直之、和気 敦、米山 彰 子、牧野 茂義、伊豆津 宏二、谷口 修 一:同種造血幹細胞移植後におけるBKV脳 炎の検討. 第39回日本造血細胞移植学会総会 (島根)

### 多発性骨髄腫に対する抗体療法のHDAC阳害による最適化の検討

平野 光人<sup>1</sup>、今井 陽一<sup>2</sup>、二見 宗孔<sup>1</sup>、東條 有伸<sup>1,2</sup> 東京大学医学研究所先端医療研究センター分子療法分野<sup>1</sup> 東京大学医科学研究所附属病院血液腫瘍内科<sup>2</sup>

### 【要約】

多発性骨髄腫は治療抵抗症例や治療に反応しても再発する症例が存在する難治性疾患である。その難治化の克服を目的として抗体療法が導入されているが、一部の症例で腫瘍免疫の低下により治療に抵抗性となることが知られている。本研究では、新規抗骨髄腫治療薬として導入されたhistone deacetylase (HDAC) 阻害薬によって、腫瘍免疫関連抗原の発現を骨髄腫細胞で変化させることにより腫瘍免疫を強化し、抗体療法を最適化できるか検討した。その結果、HDAC阻害によって腫瘍免疫関連抗原の発現が変化して抗体療法の治療効果が増強する可能性が示された。

### 【目的】

多発性骨髄腫は単クローン性抗体の産生を特徴とする機能性腫瘍(functioning tumor)であり、腎機能障害あるいは骨病変など多彩な症状を呈する。従来のメルファラン・プレドニン療法に代わる、サリドマイド、ボルテミゾブ・レナリドミドなどの新規治療薬の併用により治療反応性が約30%から60-70%に上昇している。しかし、依然多くの治療抵抗症例や治療に反応しても再発する症例が存在する難治性疾患である。

多発性骨髄腫の新規治療戦略としてエロツズマブ<sup>1)</sup> やダラツムマブ<sup>2)</sup> などの抗体療法が注目されている。骨髄腫細胞に高発現するSLAMF7抗原の認識抗体エロツズマブはレナリドミド・デキサメタゾンとの併用によりボルテゾミブ・レナリドミドの前治療歴がある症例に対しても有効性を示す。NK細胞などのエフェクター細胞は、骨髄腫細胞表面のSLAMF7抗原と結合したエロツズマブのFc部分とFc受容体を介して結合することにより活性化されて骨髄腫細胞に対して細胞傷害活性を示す(antibody-dependent cell-mediated

cytotoxicity (ADCC) 活性)。ADCC活性の活性 化には、骨髄腫細胞でのNK細胞の細胞傷害活性 化受容体の標的抗原の発現変化が重要な役割を 果たす。また、ADCC活性に加えて骨髄腫細胞 に結合した抗体が補体を活性化して骨髄腫細胞 に細胞傷害活性を示す complement-dependent cvtotoxicity (CDC) 活性も抗骨髄腫作用を担う。 特に、単剤でも有効性を示す抗CD38抗体である ダラツムマブの抗骨髄腫作用にはCDC活性が特 に大きな役割を果たす<sup>3)</sup>。一方、骨髄腫細胞表 面に発現するCD55. CD59は補体の作用を減弱 しCDC活性を阻害すると考えられ、ダラツムマ ブに対する抵抗性とCD55, CD59の発現上昇の 関連が示唆されている3)。本研究では、新規抗骨 髄腫治療薬として導入された histone deacetylase (HDAC) 阻害薬によって、これらの腫瘍免疫関 連抗原の発現を骨髄腫細胞で変化させることによ り腫瘍免疫を強化し、抗体療法を最適化できるか 検討した。特に、骨髄腫細胞が存在する骨髄微小 環境下を再現するため、骨髄腫細胞が間質細胞と 接着した状況における上記の変化も解析した。

### 【方法】

パノビノスタット(汎HDAC阻害)、ロミデプシン(HDAC1-3阻害)、ACY-1215(HDAC6阻害)などの各種HDAC阻害薬処理によるNK細胞の細胞傷害活性化受容体の標的抗原(MICA/MICB、ULBP-2/5/6)及びCD55、CD59の発現変化をU266、KMS-11、KMS-18、KMS-12PE、RPMI8226などの骨髄腫細胞株でフローサイトメトリーを用いて解析した。抗原の発現変化は、間質細胞との共培養系や細胞接着によって活性化される細胞内シグナルAkt阻害薬の処理下でも解析した。遺伝子発現の変化についても同様に解析した。さらに、骨髄腫細胞株にレンチウイルスを用いてルシフェラー

表 1 多発性骨髄腫細胞株(RPMI8226, KMS-12PE, U266, KMS-18, KMS-11)のHDAC阻害薬(pano, パノビノスタット; romi, ロミデプシン, ACY, ACY-1215)24時間処理によるMICA/MICB、ULBP-2/5/6、CD55、CD59の発現変化のフローサイトメトリー解析結果。

	MI	CA/MIC	СВ	ULBP-2/5/6		CD 55			CD 59			
細胞株	pano	romi	ACY	pano	romi	ACY	pano	romi	ACY	pano	romi	ACY
RPMI8226	上昇		上昇	不変		上昇	不変		低下	低下		低下
KMS-12PE	上昇	上昇	上昇	不変	不変	不変	不変	低下	低下	不変	不変	不変
U266	上昇	不変	不変	上昇	上昇	上昇	低下	低下	低下	低下	低下	低下
KMS-18	上昇	不変	低下	不変	不変	不変	低下	不変	低下	上昇	不変	上昇
KMS-11	不変	上昇	上昇	上昇	上昇	上昇	低下	低下	低下	不変	不変	不変

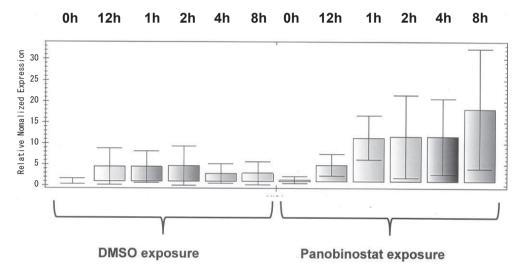


図 1 U266 細胞における DMSO およびパノビノスタット処理による MICA mRNA の発現変化 の暴露後 0, 1, 2, 4, 8, 12 時間後の経時的変化の解析。

ゼ発現ベクターを導入し、ADCC活性(エフェクター細胞存在下で治療抗体とコントロール抗体で細胞傷害活性を比較)とCDC活性(健常者血清とその非働化血清存在下で治療抗体による細胞傷害活性を比較)を評価する系を確立した。

### 【結果】

我々はパノビノスタット、ロミデプシン (HDAC1-3阻害)、ACY-1215 (HDAC6阻害) によるHDAC阻害によりNK細胞の細胞傷害活性化受容体の標的抗原MICA/MICB、ULBP-2/5/6の発現が上昇することを見出した(表1)。U266のパノビノスタット処理によってMICA

mRNAの発現が上昇し(図1)、HDAC阻害によるMICAの発現上昇は転写制御を介して調節されていることが示唆された。CDC活性については、HDAC阻害薬により骨髄腫細胞のCD55、CD59の発現が低下し抗体療法によるCDC活性が増強される可能性を示した(表1)。さらに、これらの変化が治療抵抗性に関与すると考えられる間質細胞との接着により変化することを見出した。同様に、Akt阻害薬処理でこれらの発現変化が増強し、抗原の発現制御にAktが関与することが示唆された。

### 【考察】

抗体療法においてHDAC阻害薬の併用で治療 効果が増強し抵抗性の克服をもたらす可能性が示 された。

- Lonial S, Dimopoulos M, Palumbo A, et al.: Elotuzumab therapy for relapsed or refractory multiple myeloma. N Engl J Med 373: 621-631, 2015
- Dimopoulos MA, Oriol A, Nahi H, et al.: Daratumumab, lenalidomide, and dexamethasone for multiple myeloma. N Engl J Med 375: 1319-1331, 2016
- 3. Nijhof IS, Casneuf T, van Velzen J, et al.: CD38 expression and complement inhibitors affect response and resistance to daratumumab therapy in myeloma. Blood 128: 959-970, 2016

# 骨髄異形成症候群 MDS における分化誘導因子 KLF 4の機能解明と新規抗癌治療薬の開発

森田 剣、清瀬 大樹、上久保 靖彦、足立 壯一 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻

### 【要約】

MDSおよび急性骨髄性白血病(AML)細胞に おいて、転写因子KLF4は過剰に発現するとそれ らの細胞を単球系細胞へ分化誘導し抗白血病効果 をもたらすが、その詳細な分子機構や、KLF4の 発現を効率的に誘導できる臨床医薬品はこれまで 報告がない。今回我々は、KLF4がニューロンの 分化誘導を司る DPYSLファミリー遺伝子の一つ であるDPYSL2Aのプロモーター領域に直接結 合し、転写を活性化していることを明らかにし た。さらに、DPYSL2Aはシャペロンタンパク質 CCT3に直接結合し、細胞の分化時に必須である 細胞骨格タンパク質(アクチンやチュブリン)の 産生促進に寄与している可能性が示唆された。ま た、薬剤ライブラリーを用いたスクリーニングに より、KLF4の転写活性を増強する医薬品A(特 許出現中につき現時点で掲載不可)を同定した。 医薬品AはMDS、AML細胞を効率的に単球系へ 分化誘導し、白血病モデルマウスにおいて医薬品 Aによる治療群とコントロール群の治療効果を比 較したところ、有意に生存期間を延長した。今回 の一連の研究により、KLF4が骨髄系腫瘍におい て分化誘導を促進する分子機構の一端が明らかに なり、KLF4の発現上昇を効果的に誘導する新た な分化誘導治療薬の候補が同定された。

#### 【目的】

MDSやAMLの細胞の過半数には細胞質シグナル伝達の中でも特に細胞増殖および生存に重要なRas-Raf-MEK-ERK経路の持続的な異常活性化が認めらる。正常の造血細胞では、この経路の異常活性化は細胞分化を誘導するが、MDSやAMLの細胞では細胞分化は認められない。この違いは転写因子KLF4の働きがMDSやAMLの細胞では抑制されていることに由来する<sup>1)</sup>。し

かし、KLF4が分化誘導を引き起こす詳細なメカニズムや、KLF4を誘導することで細胞の分化を誘導するような医薬品はこれまでに報告がない。そこで今回、我々は細胞分化における転写因子KLF4の分子機構の解明と、その働きを誘導し、MDSやAMLなどの造血器腫瘍細胞を分化誘導できるような新たな薬剤の開発を目的として研究を行った。

### 【方法】

実験ではMDS由来細胞株としてMOLM-13、AML由来細胞としてTHP-1を主に用いた。遺伝子発現調節には、テトラサイクリン誘導可能なshRNA発現ベクターや、遺伝子強制発現ベクターをレンチウイルスにより目的細胞へ感染させた。遺伝子発現の評価には、RT-qPCRや、Western Blot法を用いた。タンパク-タンパク結合の評価には、Mass spectrometry と免疫沈降法を用いた。

### 【結果】

まず、KLF4がどのようにMDSやAML細胞を分化するかを調べるため、I.マウス骨髄由来Tot2細胞にKLF4を過剰発現させた際に上昇する遺伝子群、II. Nras変異マウス由来の骨髄細胞で上昇する遺伝子群、III. ヒトAMLにおいてKLF4高発現症例で特異的に上昇している遺伝子群をそれぞれ1000個ずつ既報のマイクロアレイデータから同定し(GSE 38810、GSE 45194、GSE 22845)、その共通項である 26 個の遺伝子を選出した。次に、THP-1 およびMOLM-13細胞にKLF4を強制発現させ、この 26 個の遺伝子発現の変化をRT-qPCRで観察したところ、DPYSL 2遺伝子が最も大きく上昇していることが明らかになった。DPYSL 2遺伝子は、DPYSL 遺伝子ファミリーの一つであり、複数のアイソ

タイプが存在する。そこで、KLF4を強制発現させた際にどの遺伝子が上昇しているのか同様にRT-qPCRで調べたところ、DPYSL2Aが特異的に上昇していることが明らかになった。我々のレンチウイルスを用いた実験系では、KLF4の強制発現は、THP-1細胞やMOLM-13細胞において48時間~72時間で単球系への分化を誘導したが、同じ細胞で、KLF4によって誘導されたDPYSL2Aの発現をshRNAで特異的に抑制したところ、KLF4による分化誘導が認められなくなった。これらの事実は、MDSやAMLなどの骨髄系腫瘍細胞においては、DPYSL2AがKLF4による単球系への分化に必須の下流標的分子である可能性を示唆している。

DPYSL2はこれまでにニューロンの分化などに 重要であるという報告があるが、血液細胞におけ るその機能はこれまでに報告がなく、不明である。 そのため、我々は、DPYSL2A がどのように骨 髄系細胞を分化させるのか、その詳細な分子機構 を明らかにするため、DPYSL2Aと特異的に結合 するタンパク質をMass spectrometryにより同定 することを試み、結果として9個のタンパク質が DPYSL2Aに特異的に結合している可能性があ ると判明した。その中で、我々は細胞骨格タンパ ク質であるアクチンやチュブリンなどのタンパク 質の折りたたみ(フォールディング)に関与する CCT3というシャペロンタンパク質に注目した。 単球系への細胞分化では、形態学的に細胞が樹状 型の突起を伸ばし、細胞質容積も急速に大きくな る(核/細胞質比の減少)。そのため、急速な細 胞骨格タンパク質の合成と配置が必要になる。従 ってDPYSL2AがCCT3に結合し、そのシャペロ ンとしての働きを調節することで、細胞の分化に 寄与していると考えることは合理的である。実際、 免疫沈降実験ではDPYSL2AはCCT3に特異的 に結合し、さらに蛍光免疫染色ではDPYSL2A とCCT3の共在が確認された。以上の結果は、 DPYSL2AがCCT3を介して細胞の単球系への分 化を促進している可能性を示している。

次に、KLF4の発現を誘導する薬剤開発のため、 保有している薬剤ライブラリー(FDA認可有、 特許期限切れなどの薬剤から構成)約2,500種を 用い、HEK 293TにAML細胞株THP-1よりク ローニングしたKLF4のプロモーター領域を持つ ルシフェラーゼレポータープラスミドを導入し、 KLF4のプロモーター活性を上昇させる薬剤の抽 出を試みた。スクリーニングの結果をもとに、最 終的に約30種の薬剤へ候補を絞り込んだ。その 後、それらの薬剤をそれぞれ AML 由来の THP-1 細胞株へ暴露し、実際のKLF4のmRNA発現量 により薬剤の順位づけを行った。結果として今回 使用したライブラリーの中で最もKLF4の発現を 強く誘導した医薬品Aを有望な分化誘導剤とし て得た。実際、薬剤Aは当研究室で有している AML、MDSの多くの細胞株で強い細胞増殖抑制 効果とともに分化を誘導することが明らかになっ た。興味深いことに、薬剤スクリーニングで得ら れた薬剤Aの抗腫瘍活性は、KLF4やDPYSL2A の発現をshRNAを用いて抑制したAML細胞株 では減弱された。この医薬品Aはすでにヒトでは 臨床的に広く使用されているもので、高い安全性 が担保されいる。免疫不全マウス(NOG)ベー スの白血病モデルでは、医薬品Aの投与により有 意な全生存期間延長効果、および組織へのAML 細胞の浸潤抑制が確認できた。以上から、AML およびMDS細胞において、KLF4-DPYSL2A-CCT3は単球系への分化において重要な役割を担 っていることが明らかになった。さらに医薬品A を、この経路を効率的に活性化することで単球系 への分化を誘導することができる候補薬剤として 同定した。

### 【考察】

今回の一連の研究で得られたこれらの知見は、 KLF4の発現を誘導するという機序に基づくMDS やAMLに対する新しい分化誘導療法を試験的に 開発し、現行の治療では効果が得られない患者さ ん方に将来新しい選択肢の可能性を提供するもの である。今後、病院・製薬企業等と協調し、将来 の臨床応用を目指した治験について計画中である。 【文献】

 Morita K, et al.: BAALC potentiates oncogenic ERK pathway through interactions with MEKK1 and KLF4. Leukemia 29: 2248-2256, 2015

### (2) 内分泌・代謝疾患

### 糖原病Ⅲ型の遺伝子変異と機能に関する検討-3

### 大久保 実、村勢 敏郎

### 【要約】

トルコ人の糖原病III型患者からこれまでに報告のないAGL変異を同定した。糖原病III型のAGL遺伝子変異は極めて多様で、正確な診断のためにはAGLの遺伝子解析が有用である。

### 【目的】

糖原病Ⅲ型 (glycogen storage disease type III: GSD III ) はグリコーゲン蓄積病の一つで、グリコーゲン脱分枝酵素 (glycogen debranching enzyme: 遺伝子シンボルはAGL) の欠損症である $^{1}$  。この稀な代謝異常症は、肝障害・筋萎縮・心筋症・低血糖など多彩な症状を示す常染色体劣性遺伝病 $^{2}$  )で、私どもはこれまで、日本 $^{3}$  とさまざまなethnic groups  $^{4}$  の患者の遺伝子解析を報告してきた。今年度も、新たに糖原病Ⅲ型が疑われた患者を検討した。

### 【方法】

患者を対象に、35個のエクソンからなるAGL

遺伝子を直接塩基配列決定して変異を検索した。 同定した変異の近傍の遺伝子配列を両親で決定して、変異の有無を検討した。

### 【結果】

- 患者では、AGLのintron 6の+2にTからCへの一塩基置換があった(c.664+2T>C)(図1)。この変異により正常なスプライシングが行われず、酵素活性が欠損していると考えられた。
- 2. 患者の家系分析を行うと、患者は点変異の ホモ接合体であり、両親はヘテロ接合体で あった。
- 3. 両親はオーストリアへ移住したトルコ人で、 血族結婚があった。私どもがこれまでに解析 したトルコ人患者ではc.664+2T>Cはなく、 新奇な点変異であった。

### 【考察】

トルコ人の糖原病Ⅲ型患者にAGL変異を同

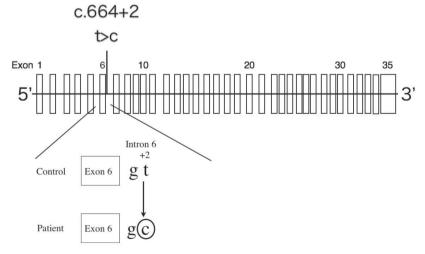


図 1 本研究で同定した*AGL* 変異 *AGL* 遺伝子のエクソンを矩形で示した。

定した。正常のスプライシングに必須なdonor splice site  $\sigma$  intron配列はGTである。新しく紹介されたトルコ人患者で同定した点変異はdonor splice site  $\epsilon$  にあり、GTからGCへと変異していた  $\epsilon$  (c.664+2T>C)。私どもがこれまでに報告した  $\epsilon$  AGL 変異の中にもスプライシング変異があったが、正常な mRNAのスプライシングが起こっていなかった  $\epsilon$  の本患者では、 $\epsilon$  に664+2T>Cによってスプライシング異常が起こり、酵素活性が欠損して糖原病 II型を発症したと考えられた。

トルコ人では血族結婚が多く、AGL変異では p.W1327Xやc.1019 delAが創始者効果により複数家系で認めた $^{7)}$ が、c.664+2T>Cはこれまで に報告はなかった。

以上のように、糖原病III型のAGL遺伝子変異は極めて多様で、正確な診断のためにはAGLの解析が有用であった。

- 大久保実: 糖原病Ⅲ型. 日本臨牀, 新領域別症 候群シリーズ19: 47-50, 2012
- 大久保実: 今日の診断指針 第7版(金澤一郎、永井良三編): 1242-1244, (医学書院, 東京, 2015)
- 3. Okubo M, et al.: Heterogeneous mutations in the glycogen-debranching enzyme gene

- are responsible for glycogen storage disease type  ${\rm I\!I}$  a in Japan. Hum Genet 106: 108-115, 2000
- 5. Okubo M, et al.: A novel donor splice site mutation in the glycogen debranching enzyme gene is associated with glycogen storage disease type Ⅲ. Biochem Biophys Res Commun 224: 493-499, 1996
- 6. Okubo M, et al.: Molecular and clinical delineation of 12 patients with glycogen storage disease type Ⅲ in Western Turkey. Clin Chim Acta 439: 162-167, 2015
- Aoyama Y, et al.: Molecular features of 23 patients with glycogen storage disease type
   III in Turkey: a novel mutation p.R1147G
   associated with isolated glucosidase deficiency, along with 9 AGL mutations. J Hum
   Genet 54: 681-686, 2009

# クッシング病におけるグルココルチコイド・ネガティブ フィードバック抵抗性のメカニズム

竹下 章、荻久保 明香、戸来 孝、右高 潤子<sup>1</sup> 井下 尚子、西岡 宏、山田 正三、竹内 靖博 聖マリアンナ医科大学解剖学<sup>1</sup>

## 【要約】

背景:ACTH産生下垂体腫瘍が原因であるクッシング病は、ACTHの過剰分泌が副腎からの高コルチゾール血症を来たし、肥満・糖尿病・高血圧・骨粗鬆症・易感染性・心脳血管障害等を高率に合併する予後不良な疾患である。健常人では、コルチゾールが過剰になると下垂体からのACTHの分泌が抑制されるネガティブフィードバック(NF)機構が働くが、クッシング病ではNFが破綻しており高コルチゾール血症に関わらずACTHの持続的分泌が認められる。しかしながらクッシング病におけるNF破綻のメカニズムは不明である。

方法:ACTH産生下垂体腺腫から抽出したRNA のうち、ACTHの前駆体であるPOMC遺伝子 の発現が高い腫瘍3例と、低い腫瘍3例を選 び、DNAマイクロアレイを用いて両群での遺 伝子発現プロファイルを比較した。続いて発 現プロファイルの異なる遺伝子を抽出し、50 例の腫瘍RNAを用いて定量リアルタイムPCR (qPCR) を行い検証した。

結果: DNAマイクロアレイにより両群間で差を 認めた遺伝子のうち28遺伝子に関してqPCR を施行した。POMC遺伝子発現を目的変数と して前進法によるステップワイズ重回帰分析を 施行したところ2つの遺伝子が説明変数として 選ばれた(R=0.795, p<0.0001)。うち正常下 垂体には発現のみられない遺伝子Xに着目し 腫瘍の免疫染色を行ったところ、約60%の症 例で蛋白発現が確認され、遺伝子発現量とも相 関が認められた。マウス ACTH産生下垂体腫 瘍細胞株(AtT-20細胞)にX遺伝子を強制発 現するとPOMC遺伝子発現が増強し、培養液 に添加したグルココルチコイドによるPOMC 発現の抑制作用が低下した。

考察:クッシング病におけるX遺伝子の異所性発現はグルココルチコイド・ネガティブフィードバック抵抗性を介してACTH過剰産生の原因のひとつとなる可能性が示唆された。

#### 【目的】

クッシング病は下垂体腺腫からのACTH過剰 分泌による高コルチゾール血症が原因である。男 女比が約1:4と女性に多く、30~40歳代を中心 に比較的広い年齢層に発症する。ACTH産生腺 腫の約8割はミクロ腺腫とよばれる1cm以下の小 さな腫瘍が多いのが特徴である。一方、周囲組織 に浸潤する大きな腫瘍は、低頻度ながら手術によ る摘出が困難で難治性である。

健常人では、コルチゾールが過剰になると下垂体からのACTHの分泌が抑制されるネガティブフィードバック(NF)機構が働くが、クッシング病ではNFが破綻しており高コルチゾール血症に関わらずACTHの持続的分泌が認められる。しかしながらクッシング病におけるNF破綻のメカニズムは不明である。

2015年、エクソーム・シークエンスによる解析によりクッシング病下垂体腺腫の1/3~2/3の症例で、脱ユビキチン化酵素USP8(Ubiquitinspecific peptidase 8)の体細胞性変異が相次いで報告された<sup>1,2)</sup>。変異USP8がどのような機序で疾患を引き起こすのか、その分子機構はいまだ不明であるが、我々はUSP8変異を持つ腫瘍(MUT)は女性で2cm以下の小さな腫瘍に多くACTHの前駆体であるPOMC遺伝子の発現が高い。一方、野生型の腫瘍(WT)は周囲組織への浸潤性の強い大きな腫瘍に多く、POMC遺伝子発現は一般

に低いことを報告した3)。

続いて昨年度の研究では、POMC遺伝子発現が高くUSP8変異陽性の腫瘍3例と、POMC遺伝子の発現が相対的に低くUSP8変異陰性の腫瘍3例を選び、DNAマイクロアレイを用いて両群での遺伝子発現プロファイルの異なる遺伝子を抽出後、50例の腫瘍RNAを用いて定量リアルタイムPCR(qPCR)を行って検証した。今年度の研究では重回帰分析によりPOMC発現を目的変数として、説明変数を選び出し、その選ばれた遺伝子が、どのような機序でPOMC発現を制御しているのかを分子学的手法を用いて明らかにすることを試みた。

## 【方法】

インフォームドコンセントを得、当院で2004年3月~2013年8月に手術したクッシング病患者の腫瘍組織からRNA抽出が可能であった60例を対象とした。内訳は女性47例と男性13例、腫瘍の大きさが1cm未満のミクロ腺腫は28例、1cm以上のマクロ腺腫は32例であった $^{3}$ )。上記60例のRNAを用いてSYBR-Green法による定量リアルタイムPCR( $^{4}$ QPCR)によりPIT1遺伝子発現を検討し、PIT1遺伝子発現が無視できる程度で正常下垂体の混在がないと判断した50例(MUT16例、WT34例)を用いて以下の検討を行った。

マイクロアレイ解析はクッシング病下垂体腫瘍 組織のうち6例(POMC遺伝子発現が高くUSP8 変異陽性MUTのミクロ腺腫3例: MUT群と POMC遺伝子の発現が相対的に低くUSP8変異陰 性で周囲組織への浸潤性の強いマクロ腺腫の3例: WT群)からtotal RNAを抽出し、Affymetrix社のGeneChip® WT PLUS Kitで処理後 Affymetrix GeneChip® Human Gene 2.0 ST Arrayを用いて 2群間で遺伝子発現プロファイルを比較した。

WTとMUTで発現が有意に異なる遺伝子に関しては正常下垂体の混在を否定した50例(MUT16例、WT34例)の腫瘍RNAを用いてqPCRによりmRNA発現を評価した。qPCRはGAPDHを内部標準とし、mRNAの発現量を補正した。正常下垂体5例の各遺伝子発現量の平均を1として表示した。

プラスミドはpTetOne (クロンテック社) 用い、full-length のX遺伝子cDNAをサブクローニングしpTetOne-Xを作成した。マウス ACTH産生下垂体腫瘍細胞株 AtT-20細胞に電気穿孔法を用いて遺伝子導入を行った。AtT-20細胞にドキシサイクリンを添加しX蛋白の発現を誘導後、細胞培養液の ACTH 濃度の測定と細胞抽出物を用いてリアルタイム PCR により POMC 発現の定量解析を行った。

## 【結果】

使用したマイクロアレイは53,981個のプローブを有し、24,670個の既知遺伝子の発現解析を行った。その結果、MUTでの発現量がWTに比べ有意に平均2倍以上(p<0.05)を呈した既知遺伝子は1,128個(POMC遺伝子も含む)、逆に1/2以下(p<0.05)の発現を呈した遺伝子数は288個であった。有意に変動する遺伝子数が多いため、倍率の高い遺伝子を30種以上、低い遺伝子を2種選び50例の腫瘍RNAを用いて計42の遺伝子について定量リアルタイムPCRを行ったところ28遺伝子でPOMC発現とR>0.3の相関を認めた。



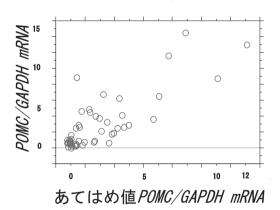


図 1 重回帰分析による POMC 遺伝子発現の予測値 と実際値の関係

前進法によるステップワイズ重回帰分析により2つの遺伝子(MAP3K遺伝子のひとつと遺伝子X)の発現量がPOMC発現を予測する説明変数として選択された。mRNAはGAPDHの発現量で補正し、正常下垂体5例の発現量の平均を1として表示した。

POMC遺伝子発現を目的変数として前進法によるステップワイズ重回帰分析を施行したところ、28遺伝子のうち2つの遺伝子(MAP3K遺伝子のひとつと遺伝子X)の発現量が説明変数として選ばれた(R=0.795, p<0.0001)(図1)。遺伝子Xは肝臓に多く発現する蛋白であり正常下垂体には発現は認められないことから、遺伝子Xのモノクローナル抗体を用いて39例のクッシング病下垂体腺腫の免疫染色を行ったところ約60%に発現が認められ、約15%では強い発現が認められた(表1)。腫瘍のX遺伝子のmRNA発現量と蛋白発現量(免疫染色スコア)には正の相関が認められ(R=0.588)(図2A)、X遺伝子のmRNAとPOMC mRNA発現量(R=0.461)(図2B)、X遺伝子の蛋白発現量とPOMC mRNA(R=0.401)(図

#### 2C) にも、正の相関が認められた。

X遺伝子がどのような機序でPOMC発現を制御するのかを調べるため、マウス ACTH産生下垂体腫瘍細胞株 AtT-20細胞に X遺伝子発現プラスミドを導入した。ドキシサイクリン添加により X蛋白の発現を誘導すると細胞内のPOMC mRNA 発現(図3A、B)と培養液の ACTH 濃度(図3C、D)は増加した。デキサメタゾンやコルチコステロンを培養液に添加するとネガティブフィードバック(NF)機構により POMC 発現やACTH 分泌が抑制されるが、X蛋白の誘導により、この抑制効果は低下した(図3A-D)。

#### 【考察】

本研究によりクッシング病の下垂体腺腫の約60%にX遺伝子の異所性発現が認められること

表 1 クッシング病下垂体腺腫39例のX蛋白の発現 X蛋白に対するモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行いスコアとして表示した。

スコア	0	1+	2+	3+
免疫染色	全て陰性	<5%で陽性	5 ~ 20 % で陽性	>20%で陽性
数 (n=39)	16	11	6	6
比率 (%)	41 %	28%	15.5%	15.5%

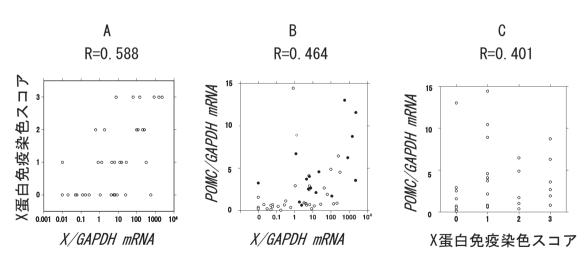


図 2 X 遺伝子およびX蛋白の発現とPOMC mRNA 発現の関連性 mRNA は GAPDHの発現量で補正し正常下垂体5例の発現量の平均を1として表示し、Spearman の順位 相関係数を用いて検定した。

- A) X mRNAとX蛋白発現量の相関
- B) X mRNAとPOMC mRNA発現量の相関
- C) X蛋白とPOMC mRNA 発現量の相関

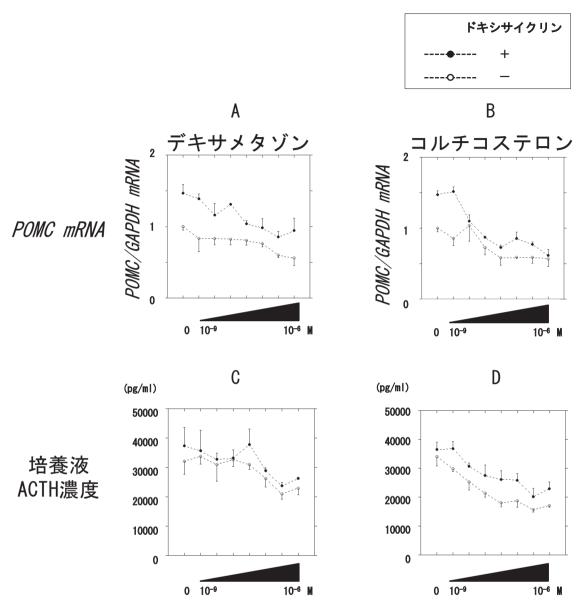


図3 ACTH産生下垂体腫瘍(AtT-20細胞)における X遺伝子強制発現の効果 X遺伝子cDNA を組み込んだpTetOne-X を AtT-20細胞に電気穿孔法を用いて遺伝子導入を行い96 穴プレートで培養した。ドキシサイクリンを添加し X蛋白の発現を誘導し24 時間後、デキサメタゾンまたはコルチコステロン( $10^{-9}\sim10^{-6}$ M)を添加し更に24 時間後に、細胞培養液の ACTH 濃度の測定と細胞抽出物を用いてリアルタイム PCR を行い細胞内 POMC mRNA の定量解析を行った。mRNA は GAPDH の発現量で補正し表示した。

が明らかとなった。重回帰分析により X遺伝子発 現と POMC 発現には強い関連性があり正の相関 が認められた。またマウス ACTH 産生下垂体腫 瘍細胞株を用いたin vitroの解析では、X蛋白の強制発現により、腫瘍細胞のPOMC遺伝子発現とACTH分泌が増強し、グルココルチコイドに

よるPOMC発現とACTH分泌抑制効果は低下した。

X蛋白は肝臓に多く発現しグルココルチコイドの代謝に関連する酵素である。従ってクッシング病におけるX遺伝子の異所性発現により、腫瘍細胞内でのグルココルチコイドの代謝が亢進することでNFが破綻し、高コルチゾール血症に関わらずACTHの持続的過剰分泌が生じる可能性が考えられた。

## 【文献】

1. Reincke M, Sbiera S, Hayakawa A, et al.:

- Mutations in the deubiquitinase gene USP8 cause Cushing's disease. Nat Genet 47: 31-38, 2015
- 2. Ma ZY, Song ZJ, Chen JH, et al.: Recurrent gain-of-function USP8 mutations in Cushing's disease. Cell Res 25: 306-317, 2015
- 3. Hayashi K, Inoshita N, Kawaguchi K,et al.: The USP8 mutational status may predict drug susceptibility in corticotroph adenomas of Cushing's disease. Eur J Endocrinol 174: 213–226, 2016

# アルドステロン産生腫瘍における Purkinje cell protein 4 (PCP4) の発現は DNA 低メチル化と関連する

沖 健司 広島大学大学院医歯薬保健学研究科分子内科学

## 【要約】

原発性アルドステロン症患者は、高血圧を呈す るのみならず、心血管疾患や慢性腎臓病の合併率 が高く、アルドステロン合成・分泌の制御は臨床 的に極めて重要である。原発性アルドステロン症 の一亜型であるアルドステロン産生腺腫 (APA) は、副腎に形成された腫瘍からアルドステロン自 律・過剰分泌を認める。APAのアルドステロン 合成は、細胞内カルシウムシグナルの活性化によ り促進されることがわかっている。我々は、ア ルドステロン合成制御の新規標的因子探索のた め、アルドステロン合成に関わるDNAメチル化 に焦点を当てたエピジェネティック調節機構によ るアルドステロン合成機構の解明を行うことを目 的とした。細胞内カルシウムシグナルに関連する PCP4 (Purkinje cell protein 4) のプロモーター 領域はAPAで低メチル化されていることがわか った。PCP4プロモーター領域のメチル化レベル は腫瘍組織におけるPCP4 mRNA発現と有意な 逆相関を認めた。ChIP-qPCR解析から、CEBPA とPCP4プロモーターの結合が示唆された。APA においてPCP4プロモーター領域は最も低メチル 化されており、同部位はCEBPAを介して調節さ れている可能性が示唆された。

# 【目的】

APAにおいてカルシウムシグナルに関与する遺伝子のDNAメチル化レベルを同定し、遺伝子発現との関連を明らかにすることを目的とした。また、同定したDNAメチル化レベルと既知のAPA遺伝子変異の関連を明らかにすることを目的とした。

#### 【方法】

非機能性副腎腫瘍(NF)12例とAPA 35例(KCNJ5 変異21例、ATP1A1変異5例、既知の遺伝子変異 を認めない9例)の腫瘍組織をDNAメチル化ビーズアレイ解析によりDNAメチル化率を算出した。また副腎皮質癌細胞株(HAC15)にKCNJ5 T158Aを過剰発現し、同様の解析を行った。CEBPA抗体を用いたChIP解析から得られた標本から、qPCRによりPCP4プロモーターとの結合を予測した。

## 【結果】

細胞内カルシウムシグナルに関連する180遺伝子におけるDNAメチル化推定部位1820箇所の解析から、PCP4はAPAで最も低メチル化されている遺伝子であった。転写開始点より上流1500bpまでのPCP4プロモーター領域に、5カ所のDNAメチル化部位が想定された。転写開始点より305bp上流のDNAメチル化レベルは、腫瘍組織におけるPCP4 mRNA発現と有意な逆相関を認めた(図1)。DNA配列から、同部位は転写因子であるCEBPA、CEBPB、BRCAとの結

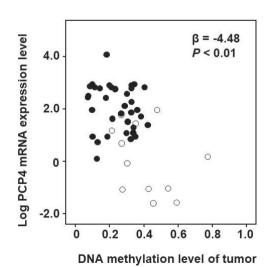


図 1 *PCP4*プロモーター領域のDNAメチル化率 と*PCP4*発現量の関連

合が示唆された。そこで、CEBPA抗体を用いたChIP-qPCR解析を行い、CEBPAで抽出した標本からPCP4プロモーター DNAが同定されたため(図2)、CEBPAとPCP4プロモーターの結合が示唆された。PCP4発現量を従属変数とした重回帰分析を行うと、DNAメチル化レベルとCEBPA発現量が有意な説明因子となった(図3)。PCP4のメチル化レベルは、APAの遺伝子

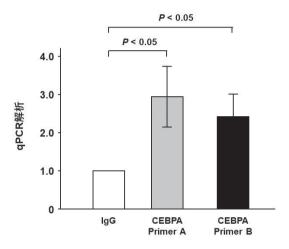


図 2 CEBPA 抗体を用いた Chlp-qPCR解析。 ChlP解析で収集した副腎標本に、 PCP4プロモーターを認識する Primer A と Primer B を用いて qPCR を行った。

変異別に有意な差を認めず、KCNJ5 T158Aを 導入したHAC15において、PCP4のメチル化レ ベルに変化を認めなかった。

## 【考察】

遺伝子プロモーター領域の低メチル化は、一般 的に転写を促進することがわかっている1)。そし て、DNAメチル化は、発癌、癌の進展、ホルモ ン合成などに関与することがわかっている<sup>1-3)</sup>。 我々の研究から、APAにおいて、カルシウムシ グナルに関わる遺伝子の中で、PCP4プロモータ ー領域は最も低メチル化しており、PCP4 mRNA レベルとDNAメチル化レベルが逆相関すること から、PCP4の発現はDNAメチル化により調節 を受けている可能性が示唆された。さらに、同 部位とCEBPAの結合が確認できたことから、 PCP4のDNAメチル化部位はCEBPAにより転 写調節されていると考えた。つまり、PCP4の発 現は、DNAのメチル化とCEBPAの発現量によ り決定されることが推察された。過去の報告か ら、APAにおいてPCP4は高発現していること、 さらに、H295RにPCP4を過剰発現するとアル ドステロン合成が促進されることがわかってい る<sup>4)</sup>。つまり、APAにおいて、PCP4はDNA脱 メチル化で発現が増加し、アルドステロン合成に 促進的に働くことが示唆された。

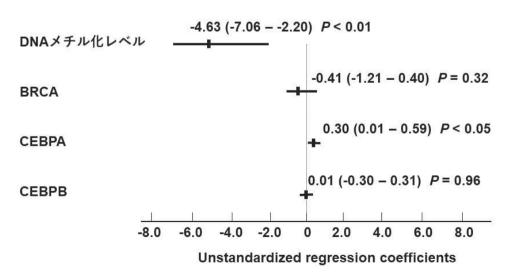


図3 PCP4発現量を決定する因子の解析。PCP4発現量を従属変数とし、重回帰分析を行ったところ、PCP4プロモーターのDNAメチル化率とCEBPA発現量が有意な説明変数であった。

# 【文献】

- Klutstein M, Nejman D, Greenfield R, Cedar H: DNA methylation in cancer and aging. Cancer Res 76: 3446-3450, 2016
- Maqbool F, Mostafalou S, Bahadar H, Abdollahi M: Review of endocrine disorders associated with environmental toxicants and possible involved mechanisms. Life Sci 145: 265-273, 2016
- 3. Yoshii Y, Oki K, Gomez-Sanchez CE, Ohno

- H, Itcho K, Kobuke K, Yoneda M: Hypomethylation of cyp11b2 in aldosterone-producing adenoma. Hypertension 68: 1432–1437, 2016
- 4. Felizola SJ, Nakamura Y, Ono Y, Kitamura K, Kikuchi K, Onodera Y, Ise K, Takase K, Sugawara A, Hattangady N, Rainey WE, Satoh F, Sasano H: Pcp4: A regulator of aldosterone synthesis in human adrenocortical tissues. J Mol Endocrinol 52: 159-167, 2014

# (3) 呼吸器疾患

# 間質性肺炎合併肺癌における治療標的因子の検討

# 宇留賀 公紀、岸 一馬、藤井 丈士

## 【要約】

目的:間質性肺炎(Interstitial pneumonia: IP)には高率に肺癌が発生するが、肺癌の治療によるIPの急性増悪が問題になる。最近、肺癌に対する薬物療法として、EGFR変異阻害薬などの分子標的治療に加えて、新たに抗programmed death 1 (PD-1) 抗体などの免疫チェックポイント阻害薬(nivolumab、pembrolizumab)を用いる免疫療法が登場した。分子標的治療も免疫療法も、重篤な副作用としてIPが報告されており、もともとIPが存在する場合には、特に慎重な治療が求められ、効果予測因子の検討は重要である。本研究では、IP合併肺癌におけるドライバー遺伝子変異ならびにPD-L1発現を検討することを目的にする。

方法:2017年1月から12月までに、当院にてIP合併非小細胞癌と診断された22例、24病変(2例は重複癌)を対象とし、患者背景とCTでのIPパターンを調査した。また、肺癌の組織型(腺癌、扁平上皮癌)、コバス®EGFR変異検出キットversion 2.0によりEGFR変異の有無、酵素抗体法(D5F3)を用いたALK転座の有無、および同じく酵素抗体法(22C3)を用いたPD-L1発現について検査を行った。

結果:性別は男性17例、女性5例で、20例が喫煙者、ブリンクマン指数の中央値は1070であった。肺癌の組織型は、扁平上皮癌 14病変、腺癌 9病変、非小細胞癌 1病変であった。腫瘍細胞でのPD-L1発現のtumor proportion score (TPS) は、5例(20.8%) が50%以上、15例(62.5%)が1-50%、4例(16.7%)が0%であった。EGFR変異は2例(9%)に認めたが、ALK転座はなかった。

結語:IP合併肺癌にはPD-L1発現が比較的高く、 免疫療法を期待できる症例も存在するが、実際 の使用にあたってはIPの急性増悪に十分な注 意が必要である。

#### 【目的】

間質性肺炎(Interstitial pneumonia: IP)には高率に肺癌が発生し、最も発生率の高い特発性肺線維症(Idiopathic pulmonary fibrosis: IPF)における各種報告では2.0-16.7%の症例に合併するとされている $^{1}$ )。反対に進行肺癌の症例の5-10%に何らかのIPを合併する。IP合併肺癌においては治療によるIPの急性増悪が問題となり、化学療法施行時の10-25%に起こり、発症時の致死率は30-50%になる。

最近、肺癌に対する薬物療法として従来からの殺細胞性抗癌剤に加えて、EGFR変異阻害薬やALK阻害剤などの分子標的治療に加えて、新たに抗programmed death 1 (PD-1) 抗体などの免疫チェックポイント阻害薬 (nivolumab、pembrolizumab) を用いる免疫療法が登場した。分子標的治療も免疫療法も重篤な副作用としてIPが報告されており、もともとIPが存在する場合には特に慎重な治療が求められ、効果予測因子の検討は重要である。本研究では、IP合併肺癌におけるドライバー遺伝子変異ならびにPD-L1発現を検討することを目的にする。

# 【方法】

2017年1月から12月までに、当院にてIP合併 非小細胞癌と診断された22例、24病変(2例は重 複癌)を対象とし、年齢、性別、喫煙歴などの患 者背景、CTでのIPパターン(Usual interstitial pneumonia(UIP)、non-UIPか)を調査した。ま た、肺癌の組織型(腺癌、扁平上皮癌)、肺癌取 扱い規約第8版に基づく病期、コバス<sup>®</sup>EGFR変 異検出キットversion 2.0によりEGFR変異の有 無、酵素抗体法(D5F3)を用いたALK転座の 有無、および同じく酵素抗体法(22C3)を用いたPD-L1発現について検査を行った。

#### 【結果】

本研究について虎の門病院 研究倫理審査委員会で承認を得た。年齢は67-89歳(中央値 78)、性別は男性17例、女性5例で、20例が喫煙者、ブリンクマン指数の中央値は1070であった(表1)。背景の間質性肺炎の種類は、IPF/UIPが9例、non-UIPが13例であった。肺癌の組織型は、扁平上皮癌 14病変、腺癌 9病変、非小細胞癌(NOS; not otherwise specified)1病変であった(表2)。病期は、IA10、IB2、IIB3、IIA4、IIB1、IVA2、術後再発2であった。腫瘍細胞でのPD-L1

発 現 の tumor proportion score (TPS) は、5例 (20.8%) が50%以上、15例 (62.5%) が1-50%、4例 (16.7%) が0%であった。*EGFR*変異は腺癌の2例 (9%) に認めたが、*ALK*転座はなかった。【考察】

IP合併肺癌においてEGFR変異を有する症例 は少なかった。一方で、PD-L1発現が比較的高く、 免疫療法を期待できる症例も存在した。

肺癌におけるEGFR変異については日本人を含めたアジア人に多いことが知られており、がん研究センター中央病院の解析では肺腺癌の46.4%に認められた $^{2)}$ 。一方で、Masaiら $^{3)}$ の報告ではIP合併肺腺癌切除例のEGFR変異の頻度は、UIP

表 1 患者背景

年齢(中央値)	67-89 (78)	
性別 男性/女性	17/5	
喫煙 あり	20	
ブリンクマン指数	0-3060 (1070)	
IPのパターン	UIP	9
IP のハダーン	non-UIP	13

IP; interstitial pneumonia, UIP; Usual interstitial pneumonia

表 2 肺癌の所見

	扁平上皮癌	14
腺癌の組織型	腺癌	9
	非小細胞癌	1
	IA	10
	IB	2
	IΙΒ	3
病期	ША	4
	<b>Ⅲ</b> B	1
	IV A	2
	術後再発	2
EGFR 変異 exon 21	L858Rあり	2
ALK 転座あり		0
DD 1.4	50%以上	5
PD-L1 (TPS)	1-50%	15
(11 0)	0%	4

TPS: tumor proportion score

合併肺腺癌では2.3%であったのに対して、UIP 非合併腺癌では45.6%であった。今回の検討でも、 EGFR変異は腺癌の2例 (9%) のみに認められ、 UIP非合併例肺腺癌と比較すると低頻度であっ た。

ALK転座については、Masaiら $^{3}$ )の報告では UIP合併肺腺癌では1例も認めなったが、UIP非合併肺腺癌では4.0%に認められた。今回の検討ではALK転座を有する肺癌はなかった。治療については、ゲフィチニブの薬剤性IP発症リスクの解析で、既存のIPの存在はオッズ比で2.89-4.80倍であることから $^{4.5}$ )、IP合併肺癌に対するEGFR阻害薬の使用は慎重に検討するべきである。

近年、PD-1やprogrammed cell death-1 ligand-1 (PD-L1), Cytotoxic T-lymphocyteassociated protein 4 (CTLA-4) などを標的とし た免疫チェックポイント阻害薬が、癌に対する新 規治療として注目されている。現在、日本で保険 承認されているPD-1阻害剤であるnivolumabと pembrolizumabは、腫瘍細胞におけるPD-L1の 免疫組織染色の陽性率が高いほど効果が高い傾向 にある<sup>6-8)</sup>。Pembrolizumabの第 I 相試験であ る KEYNOTE-001 試験では、PD-L1 TPS 50% 以上の症例では奏効率が34.2%であったのに対 して、1-49%の症例では9.3%であった $^{8)}$ 。今回 の検討でも、腫瘍細胞でのPD-L1のTPSは50% 以上が5例 (20.8%)、1-50%が15例 (62.5%) と、免疫チェックポイント阻害剤の効果が期待 できる可能性が示された。実際の使用に関して は、nivolumabとpembrolizumabともに適正使 用ガイドラインにおいてIPの合併は慎重投与に なっている。しかし、予測肺活量80%以上で、 高分解能CTで "possible UIP" かUIPに合致 しないパターンを示す軽度のIPをもつ症例では nivolumabを安全に投与可能であったとするパイ ロット試験の報告もあり<sup>9)</sup>、今後の検討が待たれ る。

## 【文献】

1. 日本呼吸器学会 腫瘍学術部会・びまん性肺

- 疾患学術部会 編集: 間質性合併肺癌に関するステートメント 南江堂, 2017
- 2. 吉田和史, 河野 隆志:【遺伝子プロファイ リングと癌治療】肺がん 癌と化学療法 43: 1321-1325, 2016
- 3. Masai K, Tsuta K, Motoi N, et al.: Clinicopathological, Immunohistochemical, and Genetic Features of Primary Lung Adenocarcinoma Occurring in the Setting of Usual Interstitial Pneumonia Pattern. J Thorac Oncol 11: 2141-2149, 2016
- 4. Ando M, Okamoto I, Yamamoto N, et al.: Predictive factors for interstitial lung disease, antitumor response, and survival in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. J Clin Oncol 24: 2549-2556, 2006
- Kudoh S1, Kato H, Nishiwaki Y, et al.: Interstitial lung disease in Japanese patients with lung cancer: a cohort and nested case-control study. Am J Respir Crit Care Med 177: 1348-1357, 2008
- Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al.: Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med 373: 1627-1639, 2015
- 7. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al.: Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med 373: 123-135, 2015
- Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al.: Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 372: 2018-2028, 2015
- 9. Fujimoto D, Morimoto T, Ito J, et al.: A pilot trial of nivolumab treatment for advanced non-small cell lung cancer patients with mild idiopathic interstitial pneumonia. Lung Cancer 111: 1-5, 2017

# 小型肺腺癌における Tumor Island の病理・臨床的検討

# 宇留賀 公紀、藤井 丈士、岸 一馬

# 【要約】

目的: Tumor islandは、肺腺癌の大型の腫瘍細胞集塊が腫瘍周囲の肺胞領域に浮遊している所見である。近年、tumor islandを有する腫瘍は術後再発率が高いことが報告され、連続切片の3D再構成を用いた解析でtumor islandは腫瘍から樹木の根のように連続性をもって伸びていることが報告された。しかし、その後は tumor islandに関する報告は、海外・本邦を含めてない。そこで今回、当院の手術例で tumor islandを有する症例の病理学的・臨床的背景とともに、tumor islandの有無が予後にどの様に影響するかについて検討を行うこととした。

方法:2003年から2009年に、当院で肺癌に対し て手術が施行され、2cm以下で肺癌取扱い規約 第7版に基づき stage IA 期と診断された 208 例 O minimally invasive adenocarcinoma (MIA) と invasive adenocarcinoma (IA) を対象とし、 islandの有無、2015年版WHO分類による肺腺 癌分類を含む病理所見、予後について検討した。 結果: 男性 106例、女性 102例、IA 166例、MIA 42例、優位な組織型はlepidic 64例、acinar 81例、papillary 48例、solid 15例であった。 Islandは14例(6.7%)に認め、男性、solid優 位の組織型、喫煙歴あり、リンパ管侵襲あり、 血管侵襲ありと有意に関連していた。生存解 析では、islandは無再発生存期間とは単変量 解析・多変量解析ともに関連していなかった  $(p = 0.349, p = 0.966)_{\circ}$ 

結論: Islandを有する症例の病理学的特徴は、従来の報告と一致していた。無再発生存期間と islandの有無とは関連しなかった。

#### 【目的】

Tumor islandは、肺腺癌の大型の腫瘍細胞集 塊が腫瘍周囲の肺胞領域に浮遊している所見で ある¹)。近年、tumor islandを有する腫瘍は術後 再発率が高いことが報告された。同論文における 連続切片の3D再構成を用いた解析では、tumor island は腫瘍から樹木の根のように連続性をもっ て伸びていることが報告されている。しかし、そ の後は tumor island に関する報告は、海外・本 邦を含めてない。そこで今回、当院の手術例で tumor islandを有する症例の病理学的・臨床的背 景とともに、tumor islandの有無が予後にどの様 に影響するかについて検討を行うこととした。

## 【方法】

本研究について虎の門病院 研究倫理審査委員 会で承認を得た。2003年から2009年に、当院で 肺癌に対して手術が施行され、2cm以下で肺癌 取扱い規約第7版に基づき stage IA期と診断さ れた208例のminimally invasive adenocarcinoma (MIA) とinvasive adenocarcinoma (IA) を対 象とした。Invasive mucinous、fetal、colloid adenocarcinomaなど稀な組織型については除外 した。Tumor islandについては、腫瘍の存在す るすべてのHE染色のスライドを検鏡し、その有 無を検討した。また、腫瘍の最大径、2015年版 WHO分類<sup>2)</sup> による肺腺癌分類 (lepidic, acinar, papillary, micropapillary, solid)、リンパ管・血 管侵襲、胸膜浸潤、壊死などの詳細な病理所 見、ならびに性別や喫煙歴などの臨床所見につ いて検討した。統計はSPSS statistical software (version 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL) を用い た。Islandの有無と症例背景については、カイニ 乗検定を用いた。生存解析は、単変量解析は生存 曲線をKaplan-Meier法により算出し、生存曲線 の比較はLog Rank検定で行った。単変量解析で p=0.20以下の因子についてCox 回帰分析を行い、 p=0.05以下を有意とした。

#### 【結果】

症例の背景は、男性 106例、女性 102例、IA 166例、MIA 42例、優位な組織型はlepidic 64例、

表 1 症例背景とislandの有無

		Islandあり (n=14)	Islandなし (n=194)	p値
年齢(65歳以上)		8	107	0.885
性別 男性/女性		11/3	95/99	0.032
喫煙 あり		11	98	0.042
	MIA	0	42	
	IA (lepidic)	0	22	
腺癌の組織型	IA (acinar)	4	77	0.000
	IA (papillary)	2	46	
	IA (solid)	8	7	
腫瘍径 10mm以上		13	179	1.000
リンパ管侵襲あり		11	3	0.006
血管侵襲あり		10	42	0.000
胸膜浸潤あり		2	26	1.000
壊死あり		2	16	0.346

MIA; minimally invasive adenocarcinoma, IA; invasive adenocarcinoma

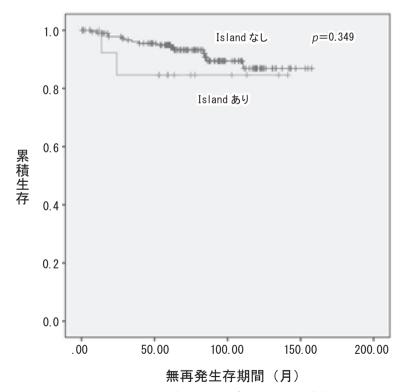


図 1 Islandの有無よるカプランマイヤー曲線

表 2	無再発生存期間の多変量解析

項目	ρ値
胸膜浸潤	0.000
組織型	0.007
リンパ管侵襲	0.205
血管侵襲	0.619
壊死	0.860
Island	0.966

acinar 81 例、papillary 48 例、solid 15 例であった。 Island は14例(6.7%)に認め、男性(p=0.032)、 喫煙歴あり (p=0.042)、solid優位の組織型 (p=0.000)、リンパ管侵襲あり (p=0.006)、血 管侵襲ありと有意に関連していた(p=0.000)(表 1)。生存の単変量解析において、無再発生存期 間はtumor islandを有する症例の中央値は122.4 ヶ月 (95%信頼区間 98.4-146.4)、ない症例の中 央値は145.3ヶ月(95%信頼区間 139.3-151.2) と有意差を認めなかった (p=0.349) (図1)。5 年での無再発生存率は、tumor islandを有する 症例で84.6%であったのに対して、ない症例で 94.9%であった。多変量解析において、胸膜浸 潤があること (p=0.000) とsolid 優位の組織型 (p=0.007) である症例において有意に無再発生 存期間が短かったが、islandの有無については有 意差を認めなかった (p=0.966) (**表2**)。

#### 【考察】

本研究では、islandを有する症例の病理学的特徴は、従来の報告と一致していた。無再発生存期間とislandの有無とは関連しなかった。

2011年にInternational Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Societyが multidisciplinary lung adenocarcinoma classification <sup>3)</sup> を発表して以降、肺腺癌の病理学的形態が予後と関連することが判明してきた。つまり、lepidic優位である症例が最も予後が良好であり、acinarとpapillaryが次に良好で、micropapillaryとsolidが最も予後不良である<sup>4.5)</sup>。

その形態重視の流れの中で、Onozato ら<sup>1)</sup> が肺 腺癌の大型の腫瘍細胞集塊が腫瘍周囲の肺胞領域 に浮遊している所見である Tumor islandを報告した。同論文の中で、261 例の stage I と II の肺腺癌の症例を対象とし、58 症例に(22.2%)に tumor islandを認めた。症例の背景との解析では、 Tumor island は solid 優位の組織型と喫煙歴を有する症例に統計学的に有意に多く認めたが、年齢、性別、リンパ管・血管侵襲、胸膜浸潤とは関連していなかった。また、5年での無再発生存率は、islandを有する症例は44.6%であったのに対し、ない症例では74.4%であり、islandを有する症例では74.4%であり、islandを有する症例では74.4%であり、islandを有する症例では14.4%であり、islandを有する症例では14.4%であり、islandを有する症例では14.4%であり、islandを有する症例では14.4%であり、islandを有する症例では14.4%であり、islandを有する症例では14.4%であり、islandを有する症例では有意に再発率が高かった(14.4%0であり、islandを有する症例では有意に再発率が高かった(14.4%0であり、islandを有する症例では有意に再発率が高かった(14.4%0であり、islandを有する症例では有意に再発率が高かった(14.4%0であり、islandを有する症例では有意に再発率が高かった(14.4%000のであり、islandを有する症例では、tumor islandは腫瘍から樹木の根のように連続性をもって伸びていることが報告されている。

本研究とOnozatoら<sup>1)</sup> の報告との比較では、症例の背景については結果がほぼ一致していた。しかし、無再発生存期間について本研究ではtumor islandを有する症例でやや再発率が高かったが、両群に有意差がなかった。この理由として、本研究はstage I の症例を対象としており、両群の再発イベント数が少なったことにより、統計的なパワーが足りなかった可能性が考えられた。生存解析については、stage II の症例を含むなどより多くの症例で検討が必要であると考えられた。

# 【文献】

- Onozato ML, Kovach AE, Yeap BY, et al.: Tumor islands in resected early-stage lung adenocarcinomas are associated with unique clinicopathologic and molecular characteristics and worse prognosis. Am J Surg Pathol 37: 287-294, 2013
- Travis W, Brambilla E, Burke A, et al.: WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2015. World Health Organization Classification of Tumours, vol. 7
- Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al.: International association for the study of lung cancer/american thoracic society/ european respiratory society international

- multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. J Thorac Oncol 6: 244-285, 2011
- Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, et al.: Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. Mod Pathol 24: 653-664, 2011
- 5. Warth A, Muley T, Meister M, et al.: The novel histologic International Association

for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification system of lung adenocarcinoma is a stageindependent predictor of survival. J Clin Oncol 30: 1438-1446, 2012

## 【発表に関連する事項】

1. Uruga H, Fujii T, Fujimori S, et al.: Semiquantitative Assessment of Tumor Spread through Air Spaces (STAS) in Early-Stage Lung Adenocarcinomas. J Thorac Oncol 12: 1046-1051, 2017

# (4) 消化器疾患

# 表在食道癌内視鏡切除後狭窄予防策の開発術後検体での組織学的検討

飯塚 敏郎

# 【要約】

目的:表在食道癌に対する標準治療として内視鏡 治療(ESD)が行われ、偶発症として最も頻度 の高い狭窄に対して、ステロイドの局注療法や PGAシート(ネオベール®)の有用性が報告さ れている。しかしその機序に関する詳細な報告 はない。そこで、今回ESD後手術を行った症 例を対象として、ESD後潰瘍瘢痕部分の組織 学的変化を検索し、PGAシートのESD後潰瘍 瘢痕形成における機序の解明ができるかを検討 した。

方法:2015年からESDを施行し、組織学的に非 治癒切除から手術が施行された12例を対象と した。PGAシートが貼付された群が5例、ケナ コルト局注群が3例、何も施行されなかった群 が4例であった。それぞれの群において、臨床 的背景や切除検体におけるESD瘢痕部の組織 学的検索を行い、比較検討を行った。

結果:予防策を行わなかった群において、切除 検体長、腫瘍長径長が小さく、それに伴い治療時間も短かったが、腫瘍長径においてのみ PGA群との間に統計学的有意差が認められた (p=0.023)。手術までの期間は概ね1か月程度 であった。粘膜下層の線維化は全症例で認められているが、内輪筋の肥厚度に関しては、ステロイド局注群とPGA群で肥厚度が大きかった。脈管の増生に関しては、3群とも半数以上に認められるのに対し、粘膜の再生は、PGA群では6割で認められたが、ステロイド局注群では十分な再生を呈した症例は1例も認められなかった。

結論:PGAシートを用いることで、人工潰瘍部では脈管の増生が増し、粘膜上皮の再生頻度が

高かった。一方でステロイド局注では、内輪筋の肥厚度が最も高く認められた。

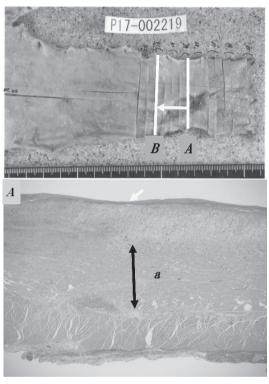
#### 【目的】

表在食道癌が多く発見され、また内視鏡治療の 進歩に伴い、大型の病変に対しても一括切除での 内視鏡治療(ESD)が可能となった。こうした進 歩の一方で、ESD後の偶発症の中で最も頻度の 高い狭窄に対する治療方法が確立していない。全 周の場合は全例狭窄を呈し、9/12周を超える場 合は68%の症例で狭窄をきたすという報告1)も ある。近年、ESD後の食道狭窄に対するステロ イドの局注療法の有用性に関する報告が散見され るようになっている<sup>2,3)</sup>が、その投与法に関する 一定のコンセンサスは得られていない。一方で、 ポリグリコール酸 (PGA) を材料とした吸収性 の縫合補強材であるPGAシート (ネオベール®) は、我々の検討でESD後の狭窄予防に有用であ る可能性が示唆された<sup>4)</sup>。しかしその機序に関す る詳細な報告はない。そこで、今回ESD後手術 を行った症例を対象として、ESD後潰瘍瘢痕部 分の組織学的変化を検索し、PGAシートのESD 後潰瘍瘢痕形成における機序の解明ができるかを 検討した。

#### 【方法】

2015年からESDを施行し、組織学的に非治癒 切除から手術が施行された14例のうち、照射の 既往がある1例と、ESD瘢痕部分が切断されている1例を除く12例を対象とした。PGAシートが 貼付された症例が5例、ケナコルト局注が行われた症例が3例、何も施行されなかった症例が4例であった。それぞれの群において、臨床的背景や 切除検体におけるESD瘢痕部の組織学的検索を 行い、比較検討を行った。組織学的検索では、通

常のHE染色に加え、Masson trichrome染色、デスミン染色、α-smooth muscle actin染色を追加し、組織学的比較検討を行った。内輪筋の肥厚度は、人工潰瘍瘢痕部と人工潰瘍部近傍の非治療部との内輪筋の肥厚度を比で示した数値を用いて比較した(図1)。また筋層内線維化、粘膜下層における脈管の増生度、粘膜の再生度に関しては、軽度、中等度、高度の3段階に分類し、高度



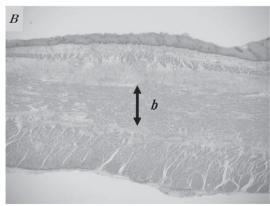


図 1 切片の選択と内輪筋肥厚部の計測方法

を呈した症例の割合で比較検討を行った(図2)。 統計学的には、2群間同士の比較を行い、連続変数は、Mann-Whitney U test もしくはStudent t test で、and カテゴリー変数は、 $\chi^2$  test または Fisher's exact test で、STATA software (ver. 11, StataCorp LP, Texas, USA) を用いて行った。 【結果】

3群間の臨床的な因子を表1に明示する。年齢、性別、腫瘍局在、深達度においては、3群間で差は認められなかった。予防策を行わなかった群において、切除検体長、腫瘍長径長が小さく、それに伴い治療時間も短かったが、腫瘍長径においてのみPGA群との間に統計学的有意差が認められた(p=0.023)。手術までの期間は概ね1か月程度であり、3群間に差は見られなかった。組織学的検討結果を表2に示す。粘膜下層の線維化は全症例で認められているが、内輪筋の肥厚に関しては、a/bの比で見ると、予防策を行わなかった群





図 2 ESD瘢痕部の粘膜下層の組織像(上段: HE 染色、下段: α-smooth muscle actin染色)

では1.2であるのに対し、ステロイド局注群では1.39、PGA群では1.37と両群で肥厚度が大きかった(統計学的差はみとめられていない)。脈管の増生に関しては、3郡とも半数以上に認められるのに対し、粘膜の再生は、PGA群では6割で認められたが、ステロイド局注群では十分な再生を呈した症例は1例も認められなかった。

#### 【考察】

食道表在癌に対するESD後の狭窄に対しては、ステロイドやPGAシートが使用され、一定の効果が得られているものの、こうした介入を行った時の生体内での変化や、狭窄を予防する機序についての検討はほとんどない。これまでに犬を使っての人工潰瘍の治癒過程の検討<sup>5)</sup> や、豚やビーグル犬を用いてのステロイド使用時の組織学的変化を検索した報告<sup>6,7)</sup> が散見される。これら

の検討では、再生上皮の状態、炎症細胞浸潤の程 度、微小血管の増生の比較などが行われている。 ステロイドを使用した群においては、再生上皮欠 損の範囲が大きく、炎症細胞浸潤の程度が高かっ たと報告されている。今回の我々の検討からは、 PGAシート群で再生粘膜の増生の程度が最も良 好であったことから、PGAシートの役割の一つ である再生の場を提供することができている可能 性が示唆された。また内輪筋の肥厚に関しては、 非治療部をコントロールにおいて、その比で検討 を行ったが、予防策を行わなかった群が最も肥厚 が少なく、ステロイド局注群とPGA群では肥厚 度が大きくなる結果であった。こちらは治療サイ ズや治療時間に比例する形となり、治癒過程で狭 窄予防策がどの程度関与できたかについて言及す ることは難しい状態である。

表 1 背景因子

	PGA シート	Steroid局注	予防策なし
症例数	5	3	4
年齢	62	64	64
性別(M:F)	3:2	3:0	4:0
場所(U:M:L)	0:4:1	1:2:0	2:2:0
平均切除検体最大長(mm)	48.8	52.7	37.8
平均腫瘍最大長(mm)	38	42.3	21.3
治療時間(mm)	73	59.3	35.3
筋層損傷例数	1	1	0
組織学的深達度(MM/SM)	4/1	1/2	2/2
偶発症(穿孔&後出血)	0	0	0

表 2 組織学的検討結果

	PGA シート	Steroid局注	予防策なし
症例数	5	3	4
手術までの期間(日)	33	31	40
粘膜下層線維化(ESD部位)	5 (100%)	3 (100%)	4 (100%)
筋層肥厚度	38	29	36.8
a/b	1.373	1.388	1.206
筋層内線維化(多いとされた数)	3 (60%)	0	1 (25%)
脈管増生度(多いとされた数)	3 (60%)	2 (67%)	2 (50%)
粘膜上皮再生(多いとされた数)	3 (60%)	0	1 (25%)

今回の検討のlimitationとして、症例数が少ないこと、また治療サイズがそれぞれの群で異なること、また治療過程の効果を反映する明瞭な指標が確立されていないことなどが挙げられた。

結論としては、PGAシートを用いることで、 人工潰瘍部では脈管の増生が増し、粘膜上皮の再 生頻度が高かった。一方でステロイド局注では、 内輪筋の肥厚度が最も高く認められた。ESD瘢 痕部に起きている組織学的変化を見ることができ たが、これが狭窄予防にどこまで関与するかにつ いては今後の課題である。

#### 【文献】

- Katada C, Muto M, Manabe T, et al.: Esophageal stenosis after endoscopic mucosal resection of superficial esophageal lesions. Gastrointest Endosc 57: 165-169, 2003
- Hanaoka N, Ishihara R, Takeuchi Y, et al.: Intralesional steroid injection to prevent stricture after endoscopic submucosal dissection for esophageal cancer: a controlled prospective study. Endoscopy 44: 1007– 1011, 2012
- Hashimoto S, Kobayashi M, Takeuchi M, et al.: The efficacy of endoscopic triamcinolone injection for the prevention of esophageal

- stricture after endoscopic submucosal dissection. Gastrointest Endosc 74: 1389-1393, 2011
- Iizuka T, Kikuchi D, Yamada A, et al.: Polyglycolic acid sheet application to prevent esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection for esophageal squamous cell carcinoma. Endoscopy 47: 341-344, 2015
- Honda M, Nakamora T, Hori Y, et al.: Process of healing of mucosal defects in the esophagus after endoscopic mucosal resection: histological evaluation in a dog model. Endoscopy 42: 1092-1095, 2010
- Honda M, Nakamora T, Hori Y, et al.: Feasibility study of corticosteroid treatment for esophageal ulcer after EMR in a canine model. J Gastroenterol 46: 866-872, 2011
- Nonaka K, Miyazawa M, Ban S, et al.: Different healing process of esophageal large mucosal defects by endoscopic mucosal dissection between with and without steroid injection in an animal model. BMC Gastroenterol 13: 72, 2013

# (5) 肝疾患

# HCV薬剤耐性から見た直接作用型抗ウイルス薬治療効果

# 芥田 憲夫、熊田 博光

#### 【要約】

C型肝炎における直接作用型抗ウイルス薬(DAA) 再治療は70%の治癒率を達成した。再治療不成功例に特徴的な新規のNS5A/5B領域アミノ酸変化はUltra-deep sequenceで確認されなかった。再治療の効果予測因子として、治療前の薬剤耐性ウイルスよりも、前治療反応性とFIB4 indexが重要であった。

【目的】C型肝炎ウイルス(HCV)における抗ウイルス療法は経口剤の直接作用型抗ウイルス薬(DAA)併用療法の登場により、副作用は軽く、高い治癒率が期待される時代となった。一方、治療前のHCV NS3/NS5A/NS5B領域における薬剤耐性の有無で治療効果が異なる上に、治癒しない場合は新規の薬剤耐性出現の問題が存在す

る<sup>1)</sup>。特に、DAA併用療法で治癒しない難治例に再度DAA併用療法を行った場合の治療成績は未だ報告されていない。今回は、難治例を中心にHCV薬剤耐性から見たDAA併用療法の再治療成績を検討した。近年、Ultra-deep sequencingを用いた微量な薬剤耐性ウイルスの検出が可能となったが<sup>2)</sup>、この臨床的有用性も検討した。

# 【方法】

HCV genotype 1bでダクラタスビル (DCV)/アスナプレビル (ASV) 併用24週間治療不成功後にレジパスビル (LDV)/ソホスブビル (SOF) 併用12週間のDAA再治療を行った54例を対象とした。

検討1: DAA 再治療の治癒率 (SVR12率; 治療終了後12週経過時点までHCV RNA 陰性持続

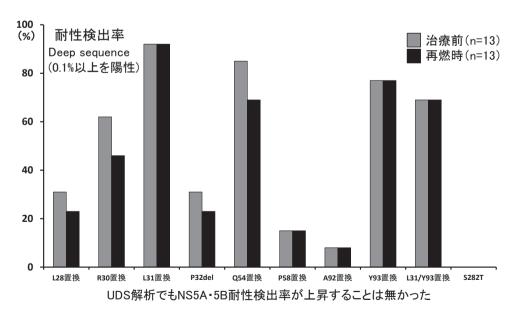


図 1 ダクラタスビル/アスナプレビル不成功後にレジパスビル/ソホスブビルを導入して不成功が 確定した、Ultra-deep sequence解析可能な13例(治療前後のNS5A・5B耐性検出率の比較)

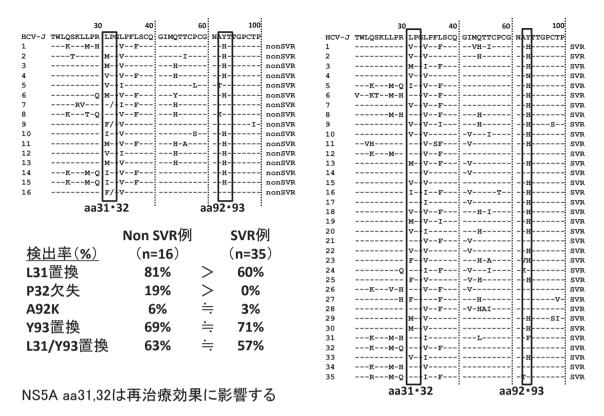


図 2 ダクラタスビル/アスナプレビル不成功後にレジパスビル/ソホスブビルを導入した Direct sequence 可能な 51 例(治療前の NS 5 A アミノ酸配列)

率)を解析。

**検討2**: DAA 再治療不成功例における薬剤耐性ウイルスの経過を解析。NS5 A/NS5 B領域の薬剤耐性変異(NS5 A 領域の28,30,31,32,54,58,92,93番目とNS5 B領域の282番目におけるアミノ酸変異を含む)の経時的推移をDirect sequence (DS)、市販の測定系、Ultra-deep sequence (UDS)で評価した<sup>3)</sup>。Deep sequencerはIon PGMTMを使用し0.1%以上を有意な変異とした。

検討3: DAA再治療効果に寄与する要因を多変量解析で検討。統計解析はカイ二乗検定と多重ロジスティック回帰分析を用いた。本研究は、虎の門病院研究倫理審査委員会で承認された研究である(研究番号1147-H・B)。

#### 【結果】

**検討1**: SVR12率は70% (38/54例)。

検討2: DS解析でDAA 再治療不成功例に特徴

的な新規NS5AとNS5Bアミノ酸変化は確認されず。UDS解析でもNS5A耐性とNS5B耐性の 検出率が上昇することは無かった(図1)。

検討3:薬剤耐性ウイルスとDAA再治療効果との関係を検討すると、非治癒例では31番目にアミノ酸置換が存在する症例や、32番目のアミノ酸が欠失した症例が多く確認された(図2)。最終的に薬剤耐性ウイルスの要因も含めて多変量解析を行った結果、DCV/ASV治療反応性(無効例以外)と肝線維化マーカーのFIB4 index(<3.25)がDAA再治療におけるSVR12に寄与する独立要因であることが確認された(図3)。

#### 【考察】

DAA再治療の成績に関する詳細な報告は今まで存在しなかった。今回の検討で、DCV/ASV不成功後のLDV/SOFは70%の治癒率を達成することが確認された。ここで生じた問題はDAA再

		単変量解析		多変量解析	
Factors	Category	P	Odds ratios	(95%CI)	P
DCV.ASV治療反応性	無効		1		
	無効以外*	<0.001	32.3	(2.22-500)	0.011
FIB4 index (線維化マーカー)	≥3.25		1		
	<3.25	0.007	13.9	(1.37-143)	0.026
AFP (μg/l)	≥20				
	<20	0.002			
eGFR (ml/min/1.73m³)	≥60				
	<60	0.006			
NS5A-P32欠失	有り				
	無し	0.027			
IL28B rs8099917遺伝子型	non TT				
	TT	0.034			

<sup>\*</sup>Breakthrough、再燃、副作用中止

前治療反応性と線維化マーカーが再治療効果に影響する

図 3 ダクラタスビル/アスナプレビル不成功後にレジパスビル/ソホスブビル再治療を施行した54例におけるSVR12に寄与する因子(多変量解析)

治療でも治癒しなかった30%の症例には、更なる強力な新規の薬剤耐性ウイルスを作ってしまうのではないかということであった。この疑問も、DSのみならずUDSを用いて再治療不成功例の治療前後の薬剤耐性ウイルスの経過を今回検討したところ、強力な新規の薬剤耐性ウイルスが出現しなかったことが確認された。

DAA再治療効果を事前に予測することは薬剤耐性ウイルス出現の予防策として重要である。今回の検討でDAA再治療効果に影響する要因として、治療前の薬剤耐性ウイルスの存在よりも、前治療反応性と肝組織の要因が重要であることが確認された。DAA再治療の適応はウイルス要因のみならず、宿主要因も加味して今後は検討する必要がある。

DAA併用療法難治かつ肝発癌リスクの高い症例を絞り込むことが日本の高齢化社会において安全かつ効果的に治療を行うためには重要である。将来的にはC型肝炎の薬剤耐性ウイルスの問題を解決し、HCV排除に伴う肝発癌抑制にまで繋げ

ることが最終的な目標と言える<sup>4)</sup>。

#### 【文献】

- 1. Akuta N, Sezaki H, Suzuki F, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, Kumada H: Favorable efficacy of daclatasvir plus asunaprevir in treatment of elderly Japanese patients infected with HCV genotype 1b aged 70 and older. J Med Virol 89: 91–98, 2017
- 2. Akuta N, Suzuki F, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H: Emergence of telaprevir-resistant variants detected by ultra-deep sequencing after triple therapy in patients infected with HCV genotype 1. J Med Virol 85: 1028-1036, 2013
- 3. Pawlotsky JM: Hepatitis C Virus Resistance to Direct-Acting Antiviral Drugs in Inter-

- feron-Free Regimens. Gastroenterology 151: 70-86, 2016
- Ogata F, Kobayashi M, Akuta N, Osawa M, Fujiyama S, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Suzuki Y, Suzuki F, Arase Y, Ikeda K, Kumada H:

Outcome of All-Oral Direct-Acting Antiviral Regimens on the Rate of Development of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Hepatitis C Virus Genotype 1-Related Chronic Liver Disease. Oncology 93: 92-98, 2017

# B型肝炎症例に対するエンテカビル治療における viral breakthrough 症例のウイルス学的検討

鈴木 文孝、熊田 博光

# 【要約】

B型慢性肝疾患に対する治療として核酸アナロ グ製剤が使用されている。エンテカビルはnaïve 例に対しては抗ウイルス効果が高く投与中にウイ ルスの再燃 (viral breakthrough) を認める症例 は少ない。Viral breakthroughを認める症例では、 エンテカビル耐性ウイルスの出現が考えられるが、 その詳細は明らかになっていない。2004年よりエ ンテカビル治療を施行しているnaïve例1094例の うちviral breakthroughを認めた16例を対象とし ウイルス学的解析を行った。HBV DNAの遺伝子 配列は、polymerase領域のreverse transcriptase 領域をPCR反応を用いてdirect sequence法に て測定した。viral breakthrough 症例のKaplan-Meier法での出現率は、5年目1.5%、10年目2.5% であった。rt領域のアミノ酸変異は、viral breakthroughを認めた16例中、8例で典型的なエン テカビル耐性ウイルス (rtL180M+rtM204Vに rtT184IまたはrtS202GまたはrtM250Vのいずれ かの変異あり)であった。また5例では、ラミブ ジン耐性変異であるrtM204V/Iの変異を伴うが典 型的なエンテカビル耐性ウイルスのパターンでは なかった。さらに1例ではアデホビル耐性である rtA181Tの変異であり、2例では耐性ウイルスを 認めなかった。エンテカビル治療の抗ウイルス効 果は非常に高いが、まれにviral breakthrough症 例を認め、ラミブジン耐性ウイルスの変異でも効 果が減弱することが示された。

#### 【目的】

B型慢性肝疾患に対する治療として核酸アナログ製剤が使用されている。このうちエンテカビルは過去に核酸アナログ製剤を使用していないnaïve例に対しては抗ウイルス効果が高く投与中にウイルスの再燃(viral breakthrough; DNA量が最低値より1 log copy/mL以上上昇)を認める

症例は少ない。しかしViral breakthrough を認める症例では、エンテカビル耐性ウイルスの出現が考えられるが、その詳細は明らかになっていない。研究の目的は、エンテカビルの長期投与中viral breakthroughを認めた症例でのウイルス学的な検討を行い、耐性ウイルスのパターンと治療効果、臨床データとの関係を明らかにすることである。

#### 【対象と方法】

対象; 2004年よりエンテカビル治療を施行している naïve 例 1094例のうち viral breakthroughを認めた16例を対象とした。HBV DNAの遺伝子配列は、polymerase 領域の reverse transcriptase [rt] 領域を PCR 反応を用いて direct sequence 法にて測定した。測定法は、既報の方法に拠った<sup>1)</sup>。

## 【成績】

(1) viral breakthrough 症例の臨床的特徴と出 現率: 男性11例、女性5例、HBe抗原陽性例15例、 全例開始時DNA量6.0以上、genotype A 1例、 C 14例、H 1例であった。Kaplan-Meier法での 出現率は、5年目1.5%、10年目2.5%であった。 (2) rt領域のアミノ酸変異; viral breakthrough を認めた16例中、8例で典型的なエンテカビル 耐性ウイルス(rtL180M+rtM204VにrtT184I またはrtS202GまたはrtM250Vのいずれかの変 異あり)であった。また5例では、ラミブジン 耐性変異であるrtM204V/Iの変異を伴うが典型 的なエンテカビル耐性ウイルスのパターンでは なかった。さらに1例ではアデホビル耐性である rtA181Tの変異であり、2例では耐性ウイルスを 認めなかった。13例でラミブジン+アデホビル の併用療法を行い、ウイルス量の低下を認めた。

#### 【結論】

エンテカビルの耐性ウイルスは、ラミブジン耐性ウイルスであるrtLl80M+rtM204VにrtA184

またはrtS202またはrtM250のいずれかの変異が 加わった3か所の変異と報告されている。今回エ ンテカビル治療で認められたviral breakthrough 症例の遺伝子配列を検討した。従来から言われ ている典型的なエンテカビル耐性以外にもラミ ブジン耐性ウイルスのみでのviral breakthrough 症例も認められた。最近の韓国からの報告2)で も同様にラミブジン耐性ウイルスからのviral breakthrough症例が報告されている。このこと はラミブジン耐性ウイルスであるrtM204V/Iの 変異出現だけでもエンテカビル抵抗性になること が示唆された。一方in vitroの測定においても、 rtM204V/I 変異はrtL180M変異の有無にかかわ らず、7.5~700倍エンテカビル耐性になること が示され3)、今回の結果を指示していると考えら れる。

## 【文献】

- 1. Suzuki F, Kumada H, Nakamura H: Changes in viral loads of lamivudine-resistant mutants and evolution of HBV sequences during adefovir dipivoxil therapy. J Med Virol 78: 1025-1034, 2006
- Cho JY, Sohn W, Sinn DH, et al.: Long-term real-world entecavir therapy in treatmentnaïve hepatitis B patients: base-line hepatitis B virus DNA and hepatitis B surface antigen levels predict virologic response. Korean J Intern Med 32: 636-646, 2017
- Ono SK, Kato N, Shiratori Y, et al.: The polymerase L528M mutation cooperates with nucleotide binding-site mutations, increasing hepatitis B virus replication and drug resistance. J Clin Invest 107: 449-455, 2001

# HBs抗原の陰性化を目指した各治療法別因子の解析

# 鈴木 義之、熊田 博光、小林 万利子

# 【要約】

これまでHBVに対する治療の目標はHBV-DNAの陰性化と肝炎の鎮静化にあったが、近年になりHCV排除と同様、その目標はさらに難しい到達点であるHBs抗原の陰性化を目指すところまできている。このため我々のグループでは、これまで様々な治療を行ってきた過去の症例の解析とともに、drug freeを目指して行ってきたsequential therapyを総括し、その長期予後と中止しえた症例の特徴をまとめ、治療中止に関わる因子(特に免疫応答に関与する因子)を検討した。更に新規核酸アナログ治療薬であるテノホビル(TDFとTAF)の成績を解析し今後HBs抗原陰性化を目指すうえでこの薬剤をどのように使用すべきかについても検討を加えたので報告する。【目的】

2000年に市販され現在最も多く使用されてい る核酸アナログ製剤はB 型慢性肝炎に対する治 療を大きく変化させこれまで不幸な転機をたどる こともあったHBVによる肝炎の急性増悪を著明 に減少させた。HCVに比べ若年の慢性肝疾患患 者数が多いB型肝炎にあって、内服薬で肝炎をコ ントロール可能とした点では大きな功績があった と考える。その結果、本疾患に対する治療の第一 選択はIFNから核酸アナログ製剤へと移行して きたのは当然の結果であった。しかしながら、治 療の最終目標であるHBs抗原の陰性化について は十分な効果が示されているとは言えず、長期化 した核酸アナログ製剤の中止を目指す指針も明ら かとなってこない。このため当院でも多くの取り 組みがなされIFN sequential therapyが有効であ ることを昨年度までに報告してきた。この症例の 中から4例のHBs抗原陰性化例を経験し、この症 例の解析とともに sequential therapy を導入した 症例の検討を行っている。さらに今年度はテノホ ビルの治療効果についてTDFとTAFの各々にお いて検討しHBs抗原陰性化を獲得するための可能性のある因子を検討したので報告する。

#### 【対象と方法】

2009年より核酸アナログ製剤の中止を目的とし てsequential therapyを導入している。本療法導 入の条件は核酸アナログ投与中、HBe抗原は陰性 で、肝酵素の正常化を維持し、HBV-DNAが感 度以下(2.1 log copy/ml未満)もしくはHBcrAg が感度以下 (3.0 log U/ml未満) を達成している 患者とした。これまでに14症例に導入し、全例 IFN投与を終了し経過観察期間 (drug free) に 入っている。それぞれの症例の背景因子を解析す るとともに、その後の経過につき検討した。さら にこのうちHBs抗原の陰性化を獲得した4例の症 例を中心に sequential therapy 治療前の背景因子 (HBs抗原量、宿主因子など) が治療反応性にど のように関わっているかにつき検討した。また、 新たな薬剤としてHBs抗原陰性化をもたらす可能 性が期待されているテノホビルの二種類の薬剤で あるTDF (409例) とTAF (77例) 投与症例に ついても解析を行った。

#### 【成績】

Sequential治療導入症例の背景は表1に示した。年齢43.5歳、男性は12例(85.7%)、肝酵素はいすれも20 IU/L以下、HBV-DNAは一例を除き2.1>log copy/mlであった。Genotypeは2例がBで残りはCであり、LMVからの中止例が10例、ETVからの中止例が4例となっている。14症例の経過を示したのが図1であるが、drug freeの達成率は71%(10/14)であり、4例(29%)にHBs抗原の陰性化が得られており有効な治療の選択肢であることが示された。治療終了後のdrug free期間は中央値90か月(84~96)である。経過中のALTは治療終了後に一過性に上昇する元がほとんどであったが、その後の再燃で再治療

表 1 IFN sequential 療法 14症例の背景

	核酸アナログ開始時	IFN開始時
年齢 (歳)	36.5 ( 25 - 57 )	43.5 ( 34 - 60 )
性別	男:女 12 (85.7%) :	2 (14.3%)
AST (IU/L)	97.5 ( 29 - 1356 )	19.5 ( 15 - 26 )
ALT (IU/L)	192 ( 32 - 2412 )	16.5 ( 12 - 26 )
HBe抗原陽性	3例 (21.4%)	0例(0%)
HBV DNA (log copy/ml)	7.4 (3.0 - 8.1)	2.1>(検出せず‐2.9)
HBV genotype	B;2例(14.3%),C;12例	(85.7%)
核酸アナログの種類	Lamivudine: 10例	Entecavir:4例

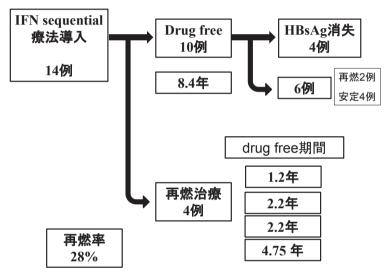


図 1 IFN sequential 療法 14症例の経過

を導入した症例が4例認められた。このうち3例は当初の目標である2年以上のdrug freeを達成している。単純中止例で当院が報告してきた再燃率68%に比べ本治療法の再燃率が28%と有意に低いことが示されている。本治療法によるHBV-DNAの陰性化率とALTの正常化率については特筆すべきものがあり、ALTはIFN開始後12か月目をピークにやや正常化率は低下するものの再治療に至らなかった症例では約3年後以降には100%安定という数字であった。一方DNAは感度以下を維持できている症例は少ないもののガイドラインでは治療域とはならない2.1から4.0の範囲内で変動している症例が多く認められてい

る。再治療となった4例の要因を解析するため経過中のHBcrAgの経過をみてみると、3症例はいずれもHBcrAgが高いままで再治療を導入され2例は依然として高値を持続している。一方再治療とならなかった症例はIFN終了直後は1例を除きすべて3以下まで低下し安定していた。これをまとめると経過中HBcrAgが3.6以下の症例からは1例の再燃があったものの再治療にはいたらず、再治療となった4例中3例はHBcrAgが5.9が1例と6.8<が2例であった。このように本療法は効率よくdrug freeを獲得することが明らかとなったが、このうちHBs抗原陰性化を獲得した4症例の背景因子を他の症例と比較したのが表2であ

表 2 IFN sequential 療法症例の背景

No	사무 모네	<b>左</b> 蚣	ganat ma	NIA 括	#088	開始時	IL28	HLADPA1	HLADPB1	最終額	<b>朗察時</b>
No.	性別	年齢	genotype	NA種	期間	HBsAg	rs8099917	rs 3077	rs9277535	ALT	DNA
3	М	60	С	ETV	100+16M	227	TT	GA	GA	17	_
13	М	53	С	LMV	123M	5.45	TG	GA	GA	18	_
4	М	43	С	LMV	76 M	1910	TT	GA	GG	21	_
5	М	55	С	LMV	100 M	119	TG	GA	GG	19	_
6	М	41	С	LMV	79 M	916	TG	GG	GG	36	2.1
8	М	36	С	LMV	66 M	785	GG	GG	GG	24	4.4
10	М	35	С	LMV	122M	6080	TG	AA	AA	20	5.1
11	М	44	С	LMV	98 M	109	TT	GG	GG	39	1.5>
12	М	49	С	LMV	76 M	1400	TT	GA	GA	20	3.3
14	F	34	С	ETV	20 M	5740	TT	GG	GA	9	2.5
1	М	60	Bj	LMV	55 M	1370	TT	GG	GG	528	5.4
2	М	41	С	LMV	94 M	1390	TT	GG	GA	388	6.9
7	М	37	С	ETV	31 M	6110	TT	GA	GA	980	7.8
9	F	59	Ва	ETV	38 M	554	TT	GG	GG	114	8.9

る。上段のNo.3.13.4.5がHBs抗原を陰性化し た症例であるが、既報のごとくHLADPA1がGA は4例ともまたそれに加えてHLADPB1もGAの 症例が2例、HBs抗原の陰性化を獲得していた。 また、これまでに sequential therapy を応用した 方法でIFNと核酸アナログを繰り返し治療する ことによりHBs抗原の陰性化を獲得した症例を 経験したが、最後に用いたテノホビル (TDF) により持続的なHBs抗原の陰性化が得られた。 このような経験から今年度はTDF投与症例の解 析も行った。TDF投与症例は、初回治療(Naïve) 群、不応例治療(rescue)群、治療切り替え群 (switch) に分け治療効果について検討した(図 2)。Naïve症例は核酸アナログ製剤初回投与とし てTDFを選択した症例であり、rescue症例は核 酸アナログに対する不応症例でTDFに切り替え またはadd on した症例である。Switch 症例は他 の核酸アナログで安定しているもののHBs抗原 量のさらなる低下を目指してTDFに切り替えた 症例である。ALT正常化率、HBV-DNA 陰性化 率(図3)とも切り替え群が最も高く、HBs抗原 量の低下については各郡に差は認められなかった (図4)。また、併用薬別で検討を行うとラミブジ

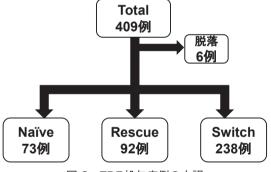


図2 TDF投与症例の内訳

ンよりもエンテカビル併用群のほうがHBs抗原の低下率が高かった。次に最近使用可能となったTAFについての成績を示す。背景は表3に示す通りで安定した状態からの薬剤の変更症例が多くなっているのが特徴である。十分な観察期間とは言えないがTDFの問題点である腎機能障害を改善させる可能性があり、図5に示すようにHBs抗原量を低下する可能性も示唆された。これらの中には一部の症例に急激なHBs抗原の低下が認められており、このような症例の特徴をとらえ、より有効な方法でHBs抗原の陰性化を目指すこと

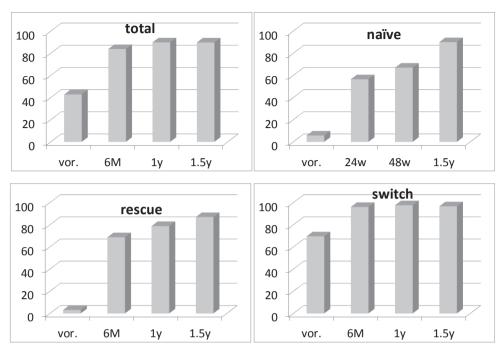


図3 TDF投与症例の治療法別のHBV-DNAの陰性化率

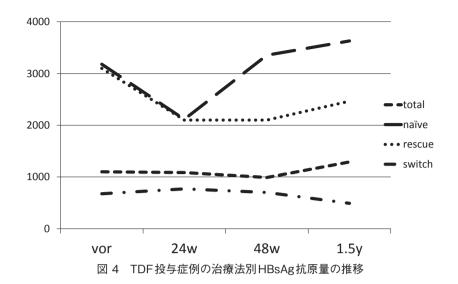
表 3 TAF 投与症例の背景

男:女	55 : 22
年齢	63 ( 28 - 88 )
AST	14 ( 14 – 514 )
ALT	21 (9 - 492)
HBV-DNA	検出せず(検出せず - 8.2)
HBsAg	450 ( 0.08 - 52000 )
HBeAg	+ 16 : - 55
Genotype A:B:C	1:10:65
CH : LC	57 : 20

が今後に期待される治療法であると考える。 【考察】

2000年に登場したLMVは確かに画期的な治療薬であり、我々は、かつてLMV投与において経年的に肝生検を行いその組織学的改善度につき報告してきた<sup>1,2)</sup>。その中でも述べたように、抗ウイルス剤投与により肝炎の鎮静化を持続することができれば、肝臓の線維化についても改善が認められることを示した。しかしながら、投与後1年

経過したあたりから耐性ウイルスが出現しそれに 伴う肝炎の再燃、重症化で難渋したことも事実で ある。その後、アデホビル、エンテカビル、テノ ホビルと登場した核酸アナログ製剤により多くの 問題が解決されたかに見えたが耐性ウイルスにつ いてはそれを防止する手段はいまだない。これ までに行ってきたSequential therapyにおいては 宿主の遺伝子を検討することでHBs抗原消失の 確率を向上させることができるかもしれない方 法に一歩近づいたと言える。特にIFN開始時の HBcrAgが低値であり genotypeB以外の症例にお いては良好な結果が得られ、有用な治療法である ことが示された。また、テノホビル製剤である TDF投与症例の中には急激なHBs抗原低下をき たす症例が認められた。その次の世代として注目 されているTAFはTDFの弱点を克服できる可能 性がありさらに詳細に検討する必要があると考え られる。今後は積極的にHBs抗原陰性化に向け た取り組みが可能であるかどうかを中心に解析を 行っていくべきと考える。宿主因子を考慮した選 択と、核酸アナログ以外の新規薬剤を組み合わせ



log

5
4
3
2
1
0
-1
2
0
4W
8W
12W
24W

図 5 TAF投与症例のHBsAg抗原量の推移

ることでより安全にかつより有効な治療法が確立 できるよう今後さらに検討を進めていくことが重 要であると考える。

# 【文献】

 Suzuki Y, Kumada H, Ikeda K, et al.: Histological changes in liver biopsies after one year of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B infection. Journal of Hepatology 30: 743-745, 1999

Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, et al.: Histological improvement after a three-year lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B in whom YMDD mutants did not or did develop. Intervirology 46:164-170, 2003

# (6) 神経内科疾患

# 筋炎症例での筋・筋膜の病理所見に関する検討 (その2)

# 前田 明子、神埼 真実、上坂 義和

## 【要約】

近年筋炎症例での画像、筋病理所見で、筋を取 り巻く間質、筋膜での変化が目立つ症例の存在が 知られてきている。特に抗ARS抗体陽性の筋炎 症例では、筋膜の変化が筋線維自体よりも強い場 合や筋線維の変化に先行する症例が多い傾向が指 摘されている。しかし、これまでに筋炎症例の筋 膜の病理所見は十分に検討されていない。我々の 昨年度の検討では、筋生検の際に筋膜を採取しえ た連続症例12例の筋膜の病理観察を行い、筋膜 の炎症性変化について評価を行い、皮膚筋炎の診 断的所見である perifascicular atrophy (PFA) を 有する症例と有さない症例での筋膜の所見の差 に注目したが、症例数が少なく有意な結果が得ら れなかった。本検討では、症例数を増やし、筋炎 の筋膜の病理所見の特徴を明らかにすること、さ らに生検部位 (筋採取部位)、筋炎自己抗体、筋 病理所見ごとの筋膜の病理所見の特徴を明らか にすることを目的とした。筋生検時に約7mm角 の筋、約2×10mmの筋膜を採取し、急速凍結 後筋は10 μm厚、筋膜は30 μm厚に薄切した。 Hematoxylin-Eosin染色、Alkaline phosphatase (ALP) 染色、抗MHC class I、CD45抗体染色を 施行しDiaminobenzidine発色後光学顕微鏡で観 察した。ランダムに筋膜厚を3点測定した平均値 を '平均筋膜厚'とした。ALP染色の半定量的評 価方法は(-)=染色性なし、(1+)=一部に点状、 (2+) = 線状、(3+) = 網目状に染色性ありとした。 2013/5/1~2017/12/31まで虎の門病院神経内科 (本院、分院) で筋・筋膜生検を施行した症例は 17 (男7、女10) 例であり、年齢は39~80(64.2± 13.7) 歳、血清 CK値は12~ 3411 (785.9 ± 969.1) U/Iに分布した。抗Jo-1、ARS、MDA5、KS、 OI抗体陽性例は各1例ずつであった。採取筋は大

腿直筋8例、上腕二頭筋4例、上腕三頭筋3例、腓 腹筋1例、前脛骨筋1例であった。平均筋膜厚は  $141 \sim 947 (412.2 \pm 248.4) \mu m$ であり、1例で筋 膜への炎症細胞浸潤を認めた。ALP染色定性評 価では、筋(3+)2例、(2+)2例、(1+)12例、 (-) 0例、情報なし1例、筋膜(1+)12例、(-)2 例、情報なし3例であった。1例でPFAを認めた。 筋病理診断は、非特異的筋炎 (NSM) 7例、皮膚 筋炎(DM)3例、封入体筋炎(IBM)3例、非炎 症性筋疾患2例、多発筋炎 (PM) 1例、筋・筋膜 炎1例であった。筋採取部位による平均筋膜厚に 有意な差はなかった。腓腹筋で採取された筋膜が 947.4 μmと肥厚していたが、部位による所見か否 かはさらなる多数例検討が必要であると考えられ た。筋、筋膜のALP染色性に採取部位差による 差は認めなかった。平均筋膜厚、ALP染色性は抗 ARS抗体の有無によって差はなかった。しかし筋 への染色性が3+であった2例で抗ARS、MDA5 抗体が陽性であったことは同抗体陽性例で筋周膜 に変化が強いという従来の見解を裏付けた。筋病 理診断ごと (NSM、IBM、PM、DM、非炎症性 筋疾患症例の5群間ごと)に平均筋膜厚、筋・筋 膜ともにALP染色性の統計学的に有意差はなかっ た。しかし、IBM群では平均筋膜厚は均一に小さ い傾向があり、他の筋炎症例との相違点となる可 能性が考えられた。

## 【背景・目的】

近年、筋炎発症早期の筋MRIで筋膜に信号変化を認める、発症早期には筋組織よりも筋膜の血管周囲優位に炎症細胞浸潤を認めやすい、という報告があり、筋炎症例での画像、筋病理所見で、筋を取り巻く間質、筋膜での変化が目立つ症例の存在が知られてきている<sup>1)</sup>。特に筋炎自己抗体の一つである、抗アミノアシルtRNA合成酵

素(ARS)抗体が陽性である筋炎症例では、筋 線維自体よりも筋膜の変化が強い場合や筋線維の 変化に先行して筋膜の変化が認められることが多 い2-5)。しかし、これまでに筋炎症例の筋膜の病 理所見の詳細は十分に検討されていない。昨年度 の検討では、筋生検の際に筋膜を採取しえた連続 症例12例の筋膜の病理観察を行い、筋膜の炎症 性変化について評価を行い、皮膚筋炎の診断的所 見である perifascicular atrophy (PFA) を有す る症例と有さない症例での筋膜の所見の差に注目 したが、症例数が少なく有意な結果が得られなか った。本検討では、症例数を増やし、筋膜の病理 所見の特徴を明らかにすること、さらに生検部位 (筋採取部位)、筋炎自己抗体、筋病理所見ごとの 筋膜の病理所見の特徴を明らかにすることを目的 とした。

#### 【方法】

## 1) 対象

2013年5月~2017年12月までに臨床的に筋炎 および筋膜炎が疑われて筋・筋膜生検を施行され、 本研究の同意が得られた20歳以上の患者

#### 2) 病理学的方法

筋生検時に約7mm角の筋および横2mm縦 10mm程度の短冊状に切離した筋膜を採取し、筋・ 筋膜をコルク片に乗せて、液体窒素で十分に冷却 したイソペンタン内で急速に凍結後、-80度ディー プフリーザー内に保存した。凍結ブロックよりク リオスタットにて筋組織は $10 \mu m$ 厚、筋膜は $30 \mu m$ 厚に薄切し切片を作成した。スライドガラス上に 切片を伸展し、風乾燥後下記染色を行った。(筋組 織ではHematoxylin-Eosin (HE) 染色、modified Gomori Trichrome染色、NADH-Tetrazolium reductase染色、Alkaline phosphatase (ALP) 染 色、myosin adenosine triphosphatase染色、免 疫染色 (抗MHC class I、MHC class II、CD4、 CD8、CD45、CD68、C5b9抗体(DAKO))を 施行し、筋膜ではHematoxylin-Eosin(HE) 染色、 ALP染色、免疫染色(抗MHC class I、MHC class II、CD4、CD8、CD45、CD68、C5b9抗体(DAKO)) を施行した。なお、免疫染色の二次抗体にはいず れもビオチン化抗マウス抗体(ウマ)(Vector社. BA-2000) を使用し、Diaminobenzidine (DAB)

で発色後、光学顕微鏡を用いて観察した。筋膜厚はランダムに3点測定し、その平均値を '平均筋膜厚'とした。ALP染色の半定量的評価方法は (-) = 染色性なし、(1+) = 一部に点状、(2+) = 線状、(3+) = 網目状に染色性ありとした。

#### 3) 臨床的検討方法

臨床経過、既往歴、合併症、血清CK値、骨格筋筋力、呼吸機能、心機能、筋CT所見等の検査所見はカルテを参照した。

#### 4) 各種診断基準

筋炎の診断基準は2004年European neuromuscular center (ENMC) criteria に基づき、皮 膚筋炎に典型的な皮疹 (Gottron's 徴候または Heliotrope皮疹)を有しかつ筋組織標本でPFA の存在が確認された場合 '確実な皮膚筋炎 (Dermatomyositis; DM)'、皮疹が無くかつCD8陽性 単核球がMHC class I を筋膜に発現した非壊死 筋線維を取り囲み侵入する像を認めた場合'確 実な多発筋炎 (Polymyositis; PM)'、それ以外は '非特異的筋炎 (Non-specific myositis; NSM)' と 診断した<sup>6)</sup>。臨床所見および筋病理所見の特徴か ら Hilton-Johns の診断基準に基づき封入体筋炎 (Inclusion body myositis; IBM) と診断した<sup>7)</sup>。 筋膜上に炎症細胞浸潤を認めた場合は'筋膜炎' と診断した。筋原性変化を認めるが、炎症性機序 を示す所見 (MHC class1の筋細胞膜への発現亢 進または炎症細胞浸潤)を欠く症例は 'mvopathv' と診断した。

## 【結果】

#### 1) 患者背景

2013年5月~2017年12月まで虎の門病院神経内科(本院、分院)で筋疾患が疑われ筋および筋膜生検を施行しえて、同意書の取得が可能であった症例は17例であった(表1)。男性は7例、女性は10例であり、年齢は39~80( $64.2 \pm 13.7$ )歳、血清CK値は12~3411( $785.9 \pm 969.1$ )U/に分布した。筋炎特異自己抗体は5例で陽性であり、抗Jo-1、ARS、MDA5、KS、OJ抗体陽性例は各1例ずつであった。

#### 2) 筋膜の病理所見のまとめ

採取筋は大腿直筋8例、上腕二頭筋4例、上腕 三頭筋3例、腓腹筋1例、前脛骨筋1例であった。

表 1 症例一覧

症例	年齢	性別	合併疾患	血清 CK 値(U/I)	筋炎特異抗 体・筋炎自 己抗体	皮疹	採取した筋	平均筋膜 厚(μm)	筋膜への 炎症細胞 浸潤	ALP染色 (筋線維/筋膜)	筋膜へ のMHC class 1 発現亢進	Perifas- cicular atrophy	筋病理診断
1	65	F	肺腺癌	856	(-)	(-)	RF	281	(-)	(+)/(+)	(-)	(-)	PM
2	45	М	GVHD	600	(-)	(-)	Delt	307	(+)	(+)/(+)	(-)	(-)	NSM, fasciitis
3	43	М	(-)	465	(-)	(-)	RF	733	(-)	(+)/(-)	(-)	(-)	Myopathy
4	74	F	(-)	838	(-)	(-)	RF	149	(-)	(+)/(-)	(-)	(-)	IBM
5	77	F	(-)	51	(-)	(-)	RF	669	(-)	(+)/(+)	(-)	(-)	Myopathy
6	73	F	ILD	1003	ARS	(-)	RF	NI	(-)	(+++)/(+)	(-)	(-)	NSM
7	52	М	GVHD	20	(-)	(-)	Bic	NI	NI	NI	NI	(-)	NSM
8	72	М	ILD	3411	MDA5	(+)	RF	492	(-)	(+++)/(+)	(-)	(-)	NSM
9	68	F	(-)	12	(-)	(-)	TA	404	(-)	(++)/(+)	(-)	(-)	NSM
10	69	F	ILD、 甲状腺癌	26	KS	(+)	Bic	NI	NI	(+)/NI	NI	(-)	DM
11	71	F	(-)	457	(-)	(-)	Delt	NI	NI	(+)/NI	NI	(-)	NSM
12	77	F	(-)	2822	Jo-1	(-)	Bic	427	(-)	(+)/(+)	(+)	(+)	DM
13	80	М	(-)	497	(-)	(-)	Bic	171	(-)	(+)/(+)	(-)	(-)	IBM
14	67	М	ILD	897	OJ	(-)	RF	446	(-)	(+)/(+)	(-)	(-)	NSM
15	39	М	(-)	49	(-)	(-)	GC	947	(-)	(+)/(+)	NI	(-)	NSM
16	75	F	HCV 感染症	1280	NI	(-)	RF	141	(-)	(++)/(+)	(-)	(-)	IBM
17	45	F	ALL、 GVHD	77	NI	(-)	Delt	192	(-)	(+)/(+)	(-)	(-)	NSM

ILD: 間質性肺炎, ALL: 急性リンパ性白血病, GVHD: graft versus host disease, NI: no information, RF; 大腿直筋, Delt: 三角筋 Bic: 上腕二頭筋, TA: 前脛骨筋, GC: 腓腹筋, PM: Polymyositis, NSM: Non-specific myositis, IBM: Inclusion body myositis DM: Dermatomyositis

平均筋膜厚は141~947 (412.2 ± 248.4) μmであり、1例で筋膜への炎症細胞浸潤を認めた。ALP染色定性評価では、筋 (3+) 2例、(2+) 2例、(1+) 12例、(-) 0例、評価不可能1例、筋膜 (1+) 12例、(-) 2例、評価不可能3例であった。1例でPFAを認めた。筋病理診断は、非特異的筋炎7例、皮膚筋炎3例、封入体筋炎3例、非炎症性筋疾患2例、多発筋炎1例、筋・筋膜炎1例であった。抗Jo-1抗体陽性の皮膚筋炎症例で筋膜の間質にMHC class1発現が亢進していた。

## 3)-1 採取筋部位別にみた筋膜評価

筋採取部位による平均筋膜厚に有意な差はなかった(図1)。しかし1例のみ腓腹筋で採取された筋膜が947.4μmと肥厚していたが、部位による差か否かは今後さらなる多数例検討が必要である。筋、筋膜のALP染色性に採取部位差による

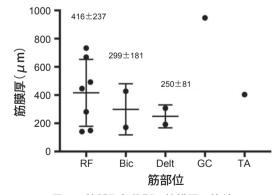
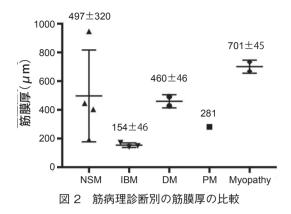


図 1 筋採取部位別の筋膜厚の比較

差は認めなかった。

3)-2 抗ARS抗体の有無でみた筋膜評価 抗ARS抗体陽性例4例と検索しえた範囲内で



の筋炎自己抗体陰性例を比較。平均筋膜厚、ALP 染色性の抗 ARS 抗体の有無による差はなかった。 3)-3 筋病理診断別にみた筋膜評価

平均筋膜厚はNSM、IBM、PM、DM、myopathy症例の5群間では統計学的に有意な差はなかった。しかし、IBM群では平均筋膜厚は薄く均一であり、NSM群ではばらつきを認めた(図2)。また5群間比較では筋、筋膜のALP染色性に差は認めなかった。

#### 【考察】

本検討では、筋炎での筋膜の病理所見の特徴を明らかにすることを目的とし、筋膜を採取し得た連続症例で免疫染色、ALP染色を含めた筋病理所見の観察を行った。筋膜に炎症所見を認めた症例は1例のみであり、筋膜の間質にMHC class 1発現が観察された症例は1例のみであった。これらの所見に関しては症例数が少ないため炎症所見やMHC class 1の発現を認めた症例の特徴をまとめるには至らなかった。

次に採取筋部位、抗ARS抗体の有無、筋病理所見ごとの平均筋膜厚、筋、筋膜へのALP染色性を観察した。統計学的な差は無かったが他の筋炎群と比較してIBM群では平均筋膜厚が小さくばらつきが少なく均一であった。このことより、IBM群では筋膜は肥厚しない傾向が疑われた。またNSMやDMのような筋膜に変化をきたすことが報告されている筋炎と比較して、IBMはむしろ筋自体に変化を来たす疾患であり、これはNSMやDMとの相違点である可能性がある。

筋膜へのALP染色の染色性は症例による差が乏しかったが、筋への染色性が3+であった2例は、各々抗ARS抗体、抗MDA5抗体が陽性の症例であった。抗ARS抗体陽性症例では、筋線維自体の変化よりも筋線維を取り巻く部位、つまり筋束の周囲(筋周鞘)に変化が強く、筋周鞘の開大および結合組織の断片化、ALP染色で筋周膜が黒色に染色され、同所見は炎症性機序を示す所見であるとされている<sup>5)</sup>。なお、近年抗MDA抗体陽性症例の中に抗ARS抗体陽性例と類似した臨床所見を呈する症例が存在することが知られて来ている<sup>8)</sup>。今回の研究結果では筋病理所見でも抗ARS抗体と同様に抗MDA5抗体陽性の症例でも筋周膜に変化が強い症例が存在する可能性が疑われた。

#### 【文献】

- Yoshida K, et al.: Fasciitis as a common lesion of dermatomyositis, demonstrated early after disease onset by en bloc biopsy combined with magnetic resonance imaging. Arthritis and rheumatism 62; 3751-3759, 2010
- Yoshifuji H, et al.: Anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibodies in clinical course prediction of interstitial lung disease complicated with idiopathic inflammatory myopathies. Autoimmunity 39; 233-241, 2006
- Ghirardello A, et al.: Autoantibodies in polymyositis and dermatomyositis. Curr Rheumatol Rep 15; 335, 2013
- Andersson H, et al.: Comparative analyses of muscle MRI and muscular function in anti-synthetase syndrome patients and matched controls: a cross-sectional study. Arthritis Res Ther 19; 17, 2017
- 5. Pestronk A: Acquired immune and inflammatory myopathies: pathologic classification. Curr Opin Rheumatol 23; 595-604, 2011
- 6. Hoogendijk J, et al.: 119th ENMC international workshop: trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis, 10-12

- October 2003, Naarden, The Netherlands. Neuromuscular disorders 14; 337-345, 2004
- Hilton-Jones D, et al.: Inclusion body myositis: MRC Centre for Neuromuscular Diseases, IBM workshop, London, 13 June 2008.
- Neuromuscular disorders 20; 142-147, 2010
- 8. Hall JC, et al.: Anti-melanoma differentiation-associated protein 5-associated dermatomyositis: expanding the clinical spectrum. Arthritis Care Res 65; 1307-1315, 2013

# BBB 透過型エピゲノム作用薬による発達障害の新しい治療法の開発

# 中山 高宏 杏林大学医学部細胞生理学

#### 【要約】

神経細胞におけるシナプス伝達に関わる syntaxin1A (stx1A) 遺伝子の発現量低下は、 発達障害の中でも特に注意欠陥障害にみられる 潜在抑制機能低下を引き起こすと共に、その発 現は非神経細胞における class-1 HDACのヒスト ン脱アセチル化酵素による抑制と神経細胞にお けるP300/CBPヒストンアセチル化酵素による 促進により、神経細胞・組織特異的に発現制御さ れていることを我々は発見してきた。本研究で は、P300/CBPに対する薬剤が神経疾患の改善に 有効であるという最新の知見に基づき、血液脳関 門 (BBB) 透過型のP300/CBPエピゲノム因子 作用ドラッグを用いたstx1A半減モデルマウス が示す注意欠陥障害に対する改善効果の有効性の 検証を行った。その結果、BBB透過型のP300/ CBP 促進剤であるCSP-TTK21をstx1A 半減モ デルマウスに投与したところ、低下していた脳内 stx1A 発現量と中脳セロトニン放出量が正常域 まで回復したと共に、注意欠陥障害の指標として 知られる潜在抑制機能が回復することが明らかと なった。これらの結果は、P300/CBP促進薬によ る脳内stx1A発現量の上昇が、中脳セロトニン 放出量の上昇と共に、注意欠陥障害の回復をもた らしていることを示しており、発達障害に対する 新たな治療法確立への道が拓かれる可能性を示唆 している。

# 【背景・目的】

エキソサイトーシスに代表される膜の融合過程は、小胞膜上のv-SNARE分子と標的膜上のt-SNARE分子との間での動的融合を基本とするSNARE機構により制御されている。その中でもt-SNAREとして神経細胞における伝達物質の開口放出の制御に関わるsyntaxin 1A (stx1A) 遺

伝子の発現量低下は、注意欠陥多動障害 (ADHD) に代表される発達障害を呈するWilliams症候 群<sup>1,2)</sup> や、注意欠陥障害(ADD)に繋がると考 えられている潜在抑制機能の低下をstx1A半減 モデルマウスで引き起こす<sup>3)</sup>ことを我々はこれま でに明らかにしてきた。加えて広範性自閉症スペ クトラム障害患者のスクリーニング解析から全体 の5%に*stx1A* 遺伝子の発現低下が起きている<sup>4)</sup> ことを明らかにしてきたことからも、stx1A遺伝 子発現の低下はADDに代表される発達障害を引 き起こすことを示しているが、stx1A 発現低下 によるADD症状に対する有効な治療法は確立さ れていない現状にある。一方で我々はこれまでに、 stx1Aがエピゲノム制御を受けている遺伝子で あり、その発現は、非神経細胞におけるclass1ヒ ストン脱アセチル化酵素 (HDAC) による抑制と 神経細胞におけるヒストンアセチル化酵素P300/ CBP (CREB Binding Protein) による促進によ って神経細胞・組織特異的に発現制御されている ことを発見してきた<sup>5,6)</sup>。興味深いことに、神経 細胞におけるstx1A発現に重要なP300/CBPに 対する促進剤が神経疾患の改善に有効である可能 性が近年提示されてきた7)ことから、本研究では、 BBB透過型のP300/CBPエピゲノム作用ドラッ グを用いることにより、stx1A半減モデルマウ スが示すADDに対する改善効果の有効性の検証 を行うことを目的とした研究を行った。

# 【方法】

8-12週齢のstx1A半接合体欠失3マウスをそれぞれ2群に分け、その内の1群をコントロールCSP、もう1群に対してはCSP-TTK21 $^{7}$ )の薬剤を1回/日、19日間のスケジュールで慢性腹腔内投与を行った。更にそれぞれの群を、音刺激による前トレーニング処理を3日行ったPre-

exposure 群と行わない Non-exposure 群の2群に分け、音と電気ショックの Pairing 刺激を行った 1日後の潜在抑制比率(Latent inhibition ratio)を算出することにより、潜在抑制機能の改善効果が算出された $^{3}$ )。潜在抑制機能解析の後、脳より海馬領域と視床下部領域を摘出し、それぞれ stxIA 特異的抗体を用いたウェスタンブロット $^{5}$  により発現量の回復を、電気化学的液体クロマトグラフィー解析(ECD-HPLC) $^{3}$  により脳内セロトニン分泌の回復を確認した。尚、上記実験は、動物倫理関連法規に従って適法に行われた。

#### 【結果】

P300/CBP促進剤CTPBを初代神経細胞に投 与したところstx1A遺伝子転写活性の上昇が見 られたことから、CTPBの改良型P300/CBP促 進剤であるTTK21に対してカーボンナノ粒子修 飾を行うことによりBBB透過性を付与したCSP-TTK21をstx1A半減モデルマウス腹腔内に慢性 投与することを行った。その結果、半減していた stx1A タンパク発現量が正常域まで回復したと 共に、低下していた中脳セロトニン分泌量が顕著 に上昇する現象が得られてきた。またこの時、潜 在抑制機能の解析を行ったところ、低下していた 潜在抑制機能が回復することが明らかとなってき た。これらの結果は、P300/CBP促進薬による脳 内stx1A遺伝子発現量の上昇が、中脳セロトニ ン放出量の上昇と共に、注意欠陥障害の症状回復 をもたらしている可能性を示しており、現在知ら れているモノアミントランスポーターに作用する 発達障害治療薬とは作用機序の異なる新たな治療 法確立への道が拓かれる可能性を示唆している。

#### 【考察】

我々によるWilliams症候群 $^{1,2}$ )やADD $^{3}$ )へのstx1Aの関与を示す報告以外にも、stx1Aの発現増加が知的障害はないものの社会性障害を持つ高機能自閉症 $^{8}$ )に関係していることも知られている。またstx1Aと共にt-SNARE複合体を形成するSNAP-25の発現量低下が注意欠陥性多動症(ADHD) $^{9}$ )に関与することが示唆されてきた。これらはt-SNARE分子異常によるシナプス前終末の機能障害が発達障害の原因となることを示していることからもt-SNARE分子に起因する

疾患治療法の確立が急がれている状況にあるが、世界的に見ても未だ報告がない現状にある。従って本研究により得られた結果は、t-SNARE分子 stx1A の発現低下が原因となる発達障害の新規治療法を確立する点において重要な意義があるものと考えられる。今後の展開として臨床応用に際して安全性の高い化合物ならびに修飾法の開発を行っていく予定である。

#### 【文献】

- 1. Nakayama T, Fujiwara T, Miyazawa A, Asakawa S, Shimizu N, Shimizu Y, Mikoshiba K, Akagawa K: Mapping of the human HPC-1/syntaxin 1A gene (Stx1A) to chromosome 7 band q11.2: Genomics 42: 173-176, 1997
- 2. Nakayama T, Matsuoka R, Kimura M, Hirota H, Mikoshiba K, Shimizu Y, Shimizu N, Akagawa K: Hemizygous deletion of the HPC-1/syntaxin 1A gene (Stx1A) in patients with Williams syndrome: Cytogenet Cell Genet 82: 49-51, 1998
- Fujiwara T, Sanada M, Kofuji T, Yoshikawa T, Akagawa K: HPC-1/syntaxin 1A gene knockout mice show abnormal behavior possibly related to a disruption in 5-HTergic systems: Eur J Neurosci 32: 99-107, 2010
- 4. Kofuji T, Hayashi Y, Fujiwara T, Sanada M, Tamaru M, Akagawa K: A part of patients with autism spectrum disorder has haploidy of HPC-1/syntaxin1A gene that possibly causes behavioral disturbance as in experimentally gene ablated mice: Neurosci Lett 644: 5-9, 2017
- 5. Nakayama T, Mikoshiba K, Akagawa K: The cell- and tissue-specific transcription mechanism of the TATA-less syntaxin 1 A gene: FASEB J 30: 525-543, 2016
- 6. Nakayama T, Akagawa K: Transcription regulation mechanism of the syntaxin 1 A gene via protein kinase A: Biochem J 474: 2465-2473, 2017

- 7. Chatterjee S, Mizar P, Cassel R, Neidl R, Selvi BR, Mohankrishna DV, Vedamurthy BM, Schneider A, Bousiges O, Mathis C, Cassel JC, Eswaramoorthy M, Kundu TK, Boutillier AL: A novel activator of CBP/p300 acetyltransferases promotes neurogenesis and extends memory duration in adult mice: J Neurosci 33: 10698-10712, 2013
- Nakamura K, Anitha A, Yamada K, Tsujii M, Iwayama Y, Hattori E, Toyota T, Suda S, Takei N, Iwata Y, Suzuki K, Matsuzaki
- H, Kawai M, Sekine Y, Tsuchiya KJ, Sugihara G, Ouchi Y, Sugiyama T, Yoshikawa T, Mori N: Genetic and expression analyses reveal elevated expression of syntaxin 1 A (Stx1A) in high functioning autism: Int J Neuropsychopharmacol 11: 1073–1084, 2008
- 9. Steffensen SC, Wilson MC, Henriksen SJ: Coloboma contiguous gene deletion encompassing Snap alters hippocampal plasticity: Synapse 22: 281-289, 1996

## (7) 腎疾患

## 多発性嚢胞腎に対するトルバプタンの安全性・有用性の検討

#### 星野 純一、小黒 昌彦、乳原 善文

#### 【要約】

目的:近年、トルバプタン(TVP)による多発性嚢胞腎(PKD)進展抑制効果が明らかとなり、臨床応用されるようになったが、腎機能に応じた有効性・安全性は明らかでない。今回、腎機能ステージごとの有効性・安全性の検討を目的とした。

方法:当院にてPKD進行抑制目的にTVPを使用 した症例を前向きに観察し、1年後の腎体積・ 腎機能(eGFR)の変化、および有害事象の有 無を評価した。

結果:診断基準を満たし、2014年6月から2015年12月までにTVP60mg/日の使用を開始したPKD症例56例の内、1年後の体積評価が可能であった52例(CKD stage G2 12例、G3a 16例、G3b 9例、G4 17例)を対象とした。1年後の腎体積変化の中央値(および四分位)は、治療前体積と比べてG2 5.7 (-0.7, 8.8)、G3a 6.7 (2.0, 17.7)、G3b 8.2 (6.0, 31.4)、G4 8.8 (4.1, 25.9) %増加した。腎機能低下とともに増大速度は多少増加する傾向を示した(p=0.59)。また、eGFR変化は、G2 -2.6 (-8.7, -0.1)、G3a -3.4 (-5.4, -0.3)、G3b -2.8 (-7.2, -1.2)、G4 -2.7 (-4.2, -0.4) ml/min/1.73m²と同等であった(p=0.81)。また投薬忍容性や副作用も同等であった。

結語:TVPはCKD進行期においても安全に使用可能であり、腎機能正常例と同等の忍容性および腎機能変化率を期待できると考えられた。 一方、CKDステージが進むとともに腎体積増加率はやや増大する傾向を示した。

#### 【目的】

多発性嚢胞腎(以下PKD)は我が国で透析導 入の第4位(日本透析医学会資料)を占める主要 疾患であるが、従来はCKD保存期のPKD患者の 嚢胞増大や腎不全進展を抑える薬剤は存在しなか った。近年バソプレッシンV2受容体拮抗薬であ るトルバプタン(TVP)による嚢胞・腎機能双 方に対する有用性が示され<sup>1)</sup>、2014年から嚢胞増 大・腎不全進展抑制目的に保険使用可能となった。 保存期PKDに対する唯一の保険認可薬として全 国的に幅広く用いられるようになったが、日本人 におけるエビデンスは不十分であり、かつCKD G3b-G4のCKD進行期患者に対するエビデンス は示されていない。TVPの有効な患者群を明ら かにし、更に最もニーズの高いCKD進行期にも 真に有効であるのかを明らかにする必要がある。

今回、わが国最大の患者数を有する当院の保存期PKD患者を対象とし、CKDステージや患者背景ごとの腎機能および腎臓体積(total kidney volume, TKV)の経時的変化を検討し、TVPが有効な患者群を明らかにすることを目的とした。 【方法】

対象は2014年6月から2015年12月までに、当 院でRavineのPKD診断基準およびTVPの保険 適応(TKV≥750mlかつ年間嚢胞増大率5%以上) を満たし、本研究参加に文書にて同意を得た上で、 嚢胞腎増大抑制目的にTVPを使用開始した症例。

治療開始時および1年後の腎機能(Estimated glomerular filtration rate, eGFR)、TKV、副作用、投薬忍容性を評価した。初期投与量(通常60mg/日)を継続もしくは増量しえた症例を忍容性ありと評価した。eGFRの評価は血清クレアチニンと年齢からMatsuoの式にて算出し<sup>2)</sup>、TKVは楕円体法を用いて評価した。

多群間比較はKruskal-Wallis検定、前後間の 比較はWilcoxon符号付順位検定、カテゴリー 変数の検定はFisher正確検定またはchi-square testを用いた。解析は全てStata Special Edition Version 14 (Stata Inc., USA) を使用した。

#### 【結果】

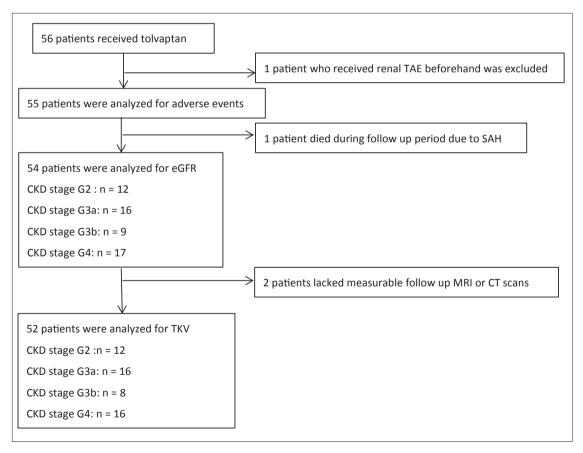
#### 1. 患者背景

観察期間中に登録された56例のPKD患者のうち、観察期間中に登録された56例のPKD患者のうち、観察期間中に腎動脈塞栓術を施行、またはくも膜下出血のためフォロー不能となった2例を除いた54例を対象とした(図1)。腎機能に応じてCKD G2 (eGFR  $\geq$  60 ml/min/1.73 m²), G3a (45  $\leq$  eGFR < 60 ml/min/1.73 m²), G3b (30  $\leq$  eGFR < 45 ml/min/1.73 m²), G4 (15  $\leq$  eGFR < 30 ml/min/1.73 m²) の4群に分類した各群の患者背景を表1に記す。各群におけるTKV

の中央値(四分位)は、G2 1072 (930, 1162) ml, G3 a 1361 (919, 1504) ml, G3 b 1568 (889, 1893) ml, G4 1779 (1204, 2138) mlであり、腎機能低下に従いTKVは有意に増加した(p=0.02)。そのほか特に患者背景で有意差を認めなかった。

#### 2. 治療前後の腎体積および腎機能の変化

対象となった54例のうち、1年後の画像評価が可能であった52例について、治療前および1年後のTKVおよび腎機能の評価を行った(表2,図2)。TKVの変化量の絶対値(ml)、治療前比(%)ともに腎機能低下群で増大する傾向を示した。ただし各群の症例数が多くなかったためか、有意差を示すには至らなかった(それぞれ



Abbreviations: eGFR, estimated glomerular filtration rate; CKD, chronic kidney disease; SAH, Subarachnoid hemorrhage; MRI, Magnetic resonance imaging; CT, computed tomography; TKV, total kidney volume.

図 1 Flowchart of the study

p=0.13, 0.34)。また、1年後の腎機能の変化量は、それぞれeGFR -2.6 (-8.7, -0.1), -3.4 (-5.4, -0.3), -2.8 (-7.2, -1.2), -2.7 (-4.2, -0.4)  $ml/min/1.73 m^2$ であり、CKDステージ群で同等と考えられた(p=0.59)。

また、観察期間中に投薬関連の重篤な副作用は認められなかった。54例のうち観察期間中に2例がくも膜下出血のため死亡もしくは投薬を中止したが、いずれもTVPとの因果関係は否定的であった。投薬忍容性はG2 100%, G3a 87.5%, G3b 77.8%, G4 82.4%であり、腎機能ステージ群間で同等であった。

#### 【結語】

近年、TVPがPKDの嚢胞増大速度を抑制し、

腎機能に保護的に働く可能性が報告され、PKD 嚢胞増大速度を抑制する可能性がある薬剤として、わが国をはじめ世界各国で保険適応され注 目されるようになった $^3$ )。一方で、腎機能低下例 に関するエビデンスは非常に少なく、本研究期 間中に発表されたREPRISE試験がほぼ唯一のエ ビデンスである。REPRISE試験はeGFR 25-65  $ml/min/1.73m^2$ のPKD患者をTVP群とプラセ ボ群の2群にランダム化し、1年後のeGFR変化 を評価した国際共同研究であり、eGFR変化量が -2.34 vs -3.61  $ml/min/1.73m^2$ と有意に抑制されることが明らかになった $(p<0.001)^4$ )。しかし、同試験では腎容積の検討はされておらず、本研究 が腎障害を有するPKD患者の腎容積変化につい

表 1 Patients' characteristics

	Total	G2	G3a	G3b	G4	Pvalue
N	54	12	16	9	17	
Age (years)						
Median	48	46.5	45.5	53	48	0.27
[IQR]	[43.3,53.0]	[38.0,51.0]	[44.8,48.25]	[47.0,55.0]	[42.0,60]	
Male sex	19 (35.2)	6 (50.0)	5 (31.3)	1 (11.1)	7 (41.2)	0.29
Height (cm)						
Median	164	168	165.8	160	158.3	0.63
[IQR]	[156.3,173.6]	[159.5,173.9]	[161.3,174.9]	[155.7,164.5]	[156.2,172.3]	
Weight (kg)						
Median	59.4	68.8	62.1	58	57	0.40
[IQR]	[53.1,68.5]	[55.0,73.6]	[54.1,65.7]	[55.2,59.6]	[50.6,66.6]	
eGFR (ml/min/1	.73m²)					
Median	45.8	65.2	52.5	29.9	28.8	
[IQR]	[32.5,56.8]	[63.8,73.65]	[48.1,55.4]	[36.9,43.3]	[21.7,32.3]	<0.001
Total Kidney Volu	ıme (ml)					
Median	1352.7	1072.4	1360.9	1567.9	1779.1	0.02
[IQR]	[1035.3,1807.3]	[930.4,1161.7]	[919.0,1503.6]	[889.1,1892.8]	[1203.9,2137.6]	
Systolic BP (mml	Hg)					
Median	124	117.5	123	124	128	0.55
[IQR]	[112.0,134.8]	[111.5,130.3]	[111.0,131.25]	[110.0,139.0]	[119.0,140.0]	
Diastolic BP (mm	nHg)					
Median	80	81	78.5	81	80	0.92
[IQR]	[74.0,85.0]	[73.8,85.25]	[76.5,82.5]	[72.0,91.0]	[74.0,86.0]	
ACEI or ARB use [%]	74.0	69.2	56.3	77.8	88.2	0.24

Note: Values for categorical variables are given as percentages; values for continuous variables are given as median [interquartile range (IQR)]

Abbreviations: IQR, interquartile range; eGFR, estimated glomerular filtration range; BP, blood pressure; ACEI, angiotensin converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin receptor blocker.

表 2 Change in total kidney volume and kidney function after 1-year tolvaptan use among CKD stages

	Total	G2	G3a	G3b	G4	P value		
Absolute change of TKV (ml)								
median	89	58	76	173	134			
[IQR]	[50, 279]	[-6, 106]	[20, 288]	[67, 422]	[82, 432]	0.13		
Relative change of $\Delta$ TKV (%)								
median	7.0	5.7	6.7	8.2	8.8			
[IQR]	[2.8, 20.1]	[-0.7, 8.8]	[2.0, 17.7]	[6.0, 31.4]	[4.1, 25.9]	0.34		
Absolute change of eGFR								
median	-3.0	-2.6	-3.4	-2.8	-2.7			
[IQR]	[-5.6, -0.3]	[-8.73, -0.1]	[-5.4, -0.3]	[-7.2, -1.2]	[-4.2, -0.4]	0.81		
Relative change of eGFR (%)								
median	-7.3	-4.2	-7.3	-7.0	-10.8			
[IQR]	[-13.8, -0.2]	[-11.8, 0.1]	[-11.2, -0.5]	[-16.7, -2.7]	[-13.9, -1.9]	0.59		
Number of discontinuation	0	0	0	1	0			
Final dose of tolvaptan (median)	60	60	60	60	60	0.72		
Tolerability (%) <sup>a</sup>	88.9	100	87.5	77.8	82.4	0.37		

Note: Values for continuous variables are given as median [interquartile range];

The eGFR and TKV after 1-year treatment were assessed by both absolute (1-year data minus baseline data) and relative values (absolute values divided by baseline).

Abbreviations: TKV, total kidney volume; IQR, interquartile range; eGFR, estimated glomerular filtration rate.

て検討した貴重な知見となる。

今回の腎機能群間比較では、CKD G4群の TKV増大速度がG2群よりも大きかった。しかし、 PKDの自然経過において、PKD増大速度は腎機能低下とともに加速することが報告されていることから $^{5)}$ 、本結果をもってTVPの効果が腎機能低下例で劣っていることを示しているわけではない。プラセボ群と比較したREPRISE 試験のような介入研究での腎容積比較検討が望まれる。

今回の研究でもう一つ重要な知見は、副作用および忍容性が腎機能低下例でも正常例と同等であったことである。TVPは強い利尿作用を有し、時には日常生活パターンの変更を余儀なくされる薬であることから、実臨床では、腎体積が著明に増大して腹部膨満症状が出現した後にTVP内服を希望する患者が多い。この時期の患者は腎機能障害を併発していることが多く、今回の臨床結果は実臨床ニーズを満たす上で非常に重要な結果と考えられる。

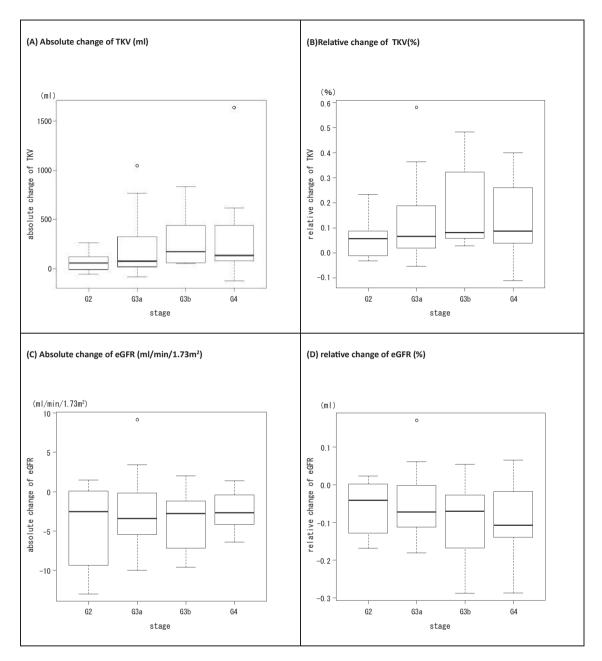
今後、更に精密なTKV測定法を用いた多数例の検討を通じて、腎機能低下例におけるTVPの

効果を検証していくとともに、TVPが真に有効な患者群を明らかにしていきたい。

#### 【文献】

- Torres VE, Chapman AB, Devuyst O, et al.: Tolvaptan in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. New England Journal of Medicine 367: 2407– 2418. 2012
- 2. Matsuo S, Imai E, Horio M, et al.: Revised equations for estimated GFR from serum creatinine in Japan. Am J Kidney Dis 53: 982-992, 2009
- 3. Gansevoort RT, Arici M, Benzing T, et al.: Recommendations for the use of tolvaptan in autosomal dominant polycystic kidney disease: a position statement on behalf of the ERA-EDTA Working Groups on Inherited Kidney Disorders and European Renal Best Practice. Nephrol Dial Transplant 31: 337-348, 2016
- 4. Torres VE, Chapman AB, Devuyst O, et al.:

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Patients were judged to tolerate their doses when the final dose of tolvaptan was equal to or higher than the initial dose (60 mg/day).



Abbreviations: TKV, total kidney volume; eGFR, estimated glomerular filtration rate.

図 2 Change in total kidney volume and kidney function after 1 -year tolvaptan use among CKD stages

Tolvaptan in Later-Stage Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. N Engl J Med 377: 1930–1942, 2017

 Grantham JJ: Clinical practice. Autosomal dominant polycystic kidney disease. N Engl J Med 359: 1477-1485, 2008

## 尿中糖鎖修飾差異による糖尿病患者における 腎予後予測因子の同定

三瀬 広記<sup>1</sup>、江口 潤<sup>1</sup>、中司 敦子<sup>1</sup>、山田 雅雄<sup>2</sup>、和田 淳<sup>1</sup> 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腎免疫内分泌代謝内科学<sup>1</sup> グライコテクニカ<sup>2</sup>

#### 【要約】

ヒトゲノムの配列が決定され、ポストゲノム研究が注目を集める中、糖尿病および糖尿病合併症の発症や進展に糖鎖異常が関与していることが報告されているが、人における糖鎖修飾と糖尿病腎症の進展における報告はない。

我々は共同研究者のグライコテクニカの開発したレクチンアレイを用いて、2型糖尿病患者の尿中における、45種類の異なる特異性をもったレクチンに結合する糖鎖を定量化した。岡山県内8施設における2型糖尿病患者のうち、2012年度(ベースライン)のeGFRが15 ml/min/1.73 m²/year以上であった675名が対象となった。アウトカムはベースラインからの30% eGFR declineまたはESRDによる腎代替療法開始とし、Cox回帰分析によってアウトカムに関連するレクチン結合糖鎖シグナルを検討した。

中央値4.0年(IQR: 3.9-4.0) の観察期間中 に63人がアウトカムを発症した。全患者におけ るベースラインのeGFRは $71.4 \pm 17.1 \text{ ml/min/}$ 1.73 m<sup>2</sup>、アルブミン尿の中央値は17.3 (mg/ gCr, IQR: 7.8-71.1) で、正常アルブミン尿、微 量アルブミン尿を呈していた患者はそれぞれ429 人 (64%)、165人 (24%) であった。単変量の みならず、ベースラインのアルブミン尿(log変 換後)やeGFRで調整した多変量Cox回帰モデ ルにおいてもアウトカムに有意に関連していた糖 鎖修飾関連レクチンはSNA、RCA120、DBA、 ABA、Jacalin、ACAであった。SNA、RCA120、 DBAに結合する特異的糖鎖はそれぞれSiaα 2-6 Gal/GalNAc, Gal $\beta$  1-4 GlcNAc, GalNAc  $\alpha$ 1-3GalNAcであり、ABA、Jacalin、ACAに共通 する特異的結合糖鎖はGal β 1-3GalNAcであった。 従って、2型糖尿病患者における尿中Sia  $\alpha$  2-6Gal/GalNAc、Gal  $\beta$  1-4GlcNAc、GalNAc  $\alpha$  1-3GalNAc、Gal  $\beta$  1-3GalNAc排泄量は有用な腎予後予測因子となり得ると考えられた。

#### 【目的】

糖尿病腎症における腎予後を予測しうる様々なバイオマーカーが報告されているが、直接的に治療戦略にまで結びついてはおらず、新たな治療ターゲットの探索が望まれている。一方、近年、糖尿病および糖尿病合併症の発症や進展に糖鎖異常が関与していることが報告されている。特に、腎臓におけるポドサイトなどの組織上の糖鎖異常は、それらの構造変化や機能異常を呈し、腎機能の悪化やアルブミン尿増加に寄与していることが分かってきた¹)。我々は糖尿病腎症患者における尿の糖鎖プロファイリングを網羅的に解析することで45種類のレクチンを同定した².3)。そこで、今回、この45種類の異なる特異性をもったレクチンに結合する糖鎖の違いと2型糖尿病患者における腎予後との関連を検討した。

#### 【方法】

岡山県内8病院の2型糖尿病患者のうち2012 年度(ベースライン)の eGFR $\geq$ 15 ml/min/1.73 m²/yearであった675名が対象となった。アウトカムはベースラインからの30% eGFR decline またはESRDによる腎代替療法開始とし、Cox回帰分析によってアウトカムに関連するレクチン結合糖鎖シグナルを検討し、既存バイオマーカーによる予後予測モデルへの上乗せ効果も検討した。

#### 【結果】

中央値4.0年(IQR: 3.9-4.0)の観察期間中 に63人がアウトカムを発症した。全患者にお

けるベースラインのeGFRは $71.4 \pm 17.1 \text{ ml}$ / min/1.73m<sup>2</sup>、アルブミン尿の中央値は17.3 (mg/ gCr, IQR: 7.8-71.1) で、正常・微量アルブミン尿 を呈していた患者はそれぞれ429人(64%)、165 人(24%)であった。単変量と、ベースラインの アルブミン尿やeGFRで調整した多変量Cox回帰 モデル双方においてアウトカムに有意に関連して いた糖鎖関連レクチンはSNA (HR: 1.42 [95%CI: 1.14-1.76]), RCA120 (1.28 [1.01-1.64]), DBA (0.80 [0.64-0.997]), ABA (1.29 [1.02-1.64]), Jacalin (1.30 [1.02-1.67]), ACA (1.32 [1.04-1.67]) であった。SNA、RCA120、 DBAに結合する特異的糖鎖はそれぞれSiaα 2-6 Gal/GalNAc, Gal $\beta$ 1-4 GlcNAc, GalNAc $\alpha$ 1-3GalNAcであり、ABA、Jacalin、ACAに共通 する特異的結合糖鎖はGal β1-3GalNAcであっ た。またこれら6種類の糖鎖シグナルをベースライ ンのアルブミン尿やeGFRなどで構成されたモデ ルに加えることでアウトカムの予測能は有意に向 上することが示された(NRI: 0.51 [95%CI: 0.22-0.80], rIDI: 0.18 [0.01-0.35], AIC  $296 \rightarrow 287$ ). 【考察】

糖 尿 病 患 者 に お け る 尿 中  $Sia \alpha 2-6 Gal/GalNAc$ 、GalNAc、GalNAc の 1-3 GalNAc、 $Gal \beta 1-3 GalNAc$ 排泄量は有用な 腎予後予測因子となり得ると考えられた。 現在、これらの糖鎖修飾の変化が実際の糖尿病腎症の組織上でどのように変わっているかを動物モデルおよび人腎組織において検討中である。

#### 【文献】

1. Song K, Fu J, Song J, et al.: Loss of mucin-

- type O-glycans impairs the integrity of the glomerular filtration barrier in the mouse kidney. J Biol Chem 292: 16491-16497, 2017
- 2. Kuno A, Uchiyama N, Koseki-Kuno S, et al.: Evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray: a new strategy for glycan profiling. Nat Methods 2: 851-856, 2005
- 3. Inoue K, Wada J, Eguchi J, et al.: Urinary fetuin-A is a novel marker for diabetic nephropathy in type 2 diabetes identified by lectin microarray. PLoS One 8: e77118, 2013

#### 【発表に関する事項】

- Mise K, Yamaguchi Y, Hoshino J, Ueno T, Sekine A, Sumida K, Yamanouchi M, Hayami N, Suwabe T, Hiramatsu R, Hasegawa E, Sawa N, Fujii T, Hara S, Sugiyama H, Makino H, Wada J, Ohashi K, Takaichi K, Ubara Y: Paratubular basement membrane insudative lesions predict renal prognosis in patients with type 2 diabetes and biopsyproven diabetic nephropathy. PLoS One 12: e0183190, 2017
- Mise K, Ueno T, Hoshino J, Hazue R, Sumida K, Yamanouchi M, Hayami N, Suwabe T, Hiramatsu R, Hasegawa E, Sawa N, Fujii T, Hara S, Wada J, Makino H, Takaichi K, Ohashi K, Ubara Y: Nodular lesions in diabetic nephropathy: Collagen staining and renal prognosis. Diabetes Res Clin Pract 127: 187-197, 2017

## (8) 消化器外科疾患

食道癌術後における消化態経腸栄養剤(ハイネイーゲル®)と半消化 態栄養剤(メイン®)の有効性に関する前向きランダム化比較試験

大倉 遊、上野 正紀、飯塚 敏郎、宇田川 晴司

#### 【要約】

目的:食道癌術後の早期経腸栄養剤の有効性は示されているものの、頻回の下痢により栄養剤の変更を余儀なくされる症例も少なくない。従来のメイン®と糖質・脂質・タンパクのバランスがほぼ同等である消化態栄養剤ハイネイーゲル®の使用にあたり、下痢の頻度軽減や術後栄養状態改善について明らかにすることを目的とした。

方法:2015年12月から2017年9月まで当院での 食道癌患者122例中、適格基準に合致した67例 をランダムに2群に割り付け、HINE群 (n=33) とMEIN群 (n=34) として、下痢の発生頻度 や中長期的な栄養状態について比較検討をし た。

結果: Bristol scale type 6、7の下痢の頻度は、HINE群は有意に低かった (21.2 % vs. 61.8 %, p= 0.001)。また栄養剤完遂率に関しては、HINE群が有意に高値であった (97.4 % vs. 86.6 %, p= 0.002)。術後合併症は、MEIN群で頸部リンパ廔が多く見られたが、その他は有意な差は認められなかった。術後6か月でのCONUT scoreや総蛋白はHINE群で有意に栄養状態の改善が見られた (p=0.030/p=0.023)。その他の栄養指標に関しては両群で有意差は認められなかった。また体重変化や体組成の変化(体脂肪率、骨格筋量)に関しても差は認められなかった。

結語:食道癌術後の経腸栄養剤として、ハイネイーゲル®はメイン®と比較し、下痢を減少させ、 術後栄養剤投与計画に沿った栄養剤投与を可能 にした。さらに、術後中長期にわたり、免疫賦 活栄養剤であるメイン®と同程度かやや良好な 栄養成績が得られたことから、術後ハイネイー ゲル®も選択肢の一つとなりえるだろう。

#### 【目的

術後早期経腸栄養剤投与は、創傷治癒を促し 術後合併症軽減に有用であるとされている1-5)。 消化器外科領域でも最も侵襲が高い手術の一つで ある食道癌術後において、早期経腸栄養は、過度 の炎症反応を抑え、免疫学的にも有効であること が示されている<sup>6-8)</sup>。虎の門病院では半消化態 栄養剤であるメイン®を食道癌術後に経管栄養剤 として使用している。メイン®はホエイペプチド や、またEPA/DHAを配合しn-3系脂肪酸を強 化し、術後抗炎症作用、抗酸化作用、抗菌作用 や免疫調整作用を有する Immuno-Nutrition であ る<sup>7-8)</sup>。臨床的にも術後合併症軽減や在院日数の 短縮等の有効性が示されている<sup>9)</sup>。しかしながら、 実際の臨床現場において頻回の下痢により栄養剤 の変更を余儀なくされる症例も少なくない。それ に伴い有効な栄養管理ができず、さらにADL低 下にもつながり、結果として術後回復遅延を招く 可能性も懸念された。より下痢が少なく食事開始 まで中断することなく投与を継続でき、メイン® に匹敵するような、術後回復促進に寄与する栄養 剤の選択が重要である。そこで、従来のメイン® と糖質・脂質・タンパクのバランスがほぼ同等で あり、乳タンパクを使用せず、浸透圧を抑えた消 化態栄養剤ハイネイーゲル®の使用にあたり、ラ ンダム化比較試験を行なうことにより、下痢の発 生頻度や術後長期的な栄養状態における最適な術 後経腸栄養剤について明らかにすることを目的と した。

#### 【方法】

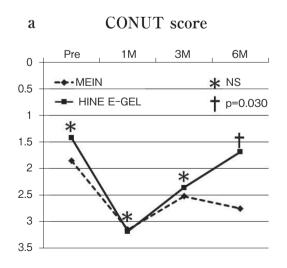
研究デザイン:食道癌術後の経腸栄養剤とし

て消化熊栄養剤であるハイネイーゲル®(大塚製 薬)と半消化態栄養剤であるメイン®(株式会社 明治) の有効性につき、前向き無作為ランダム 化比較試験を行なった。2015年12月から2017年 9月まで当院での122例の食道癌のうち、以下の 適格基準に合致した67例を、乱数表を用いてラ ンダムに2群に割り付け、HINE群 (n=33) と MEIN群 (n=34) とした。選択基準は①Siewert tvpe I/Iの接合部癌を含む食道癌、②年齢20 歳以上、③胃拳上再建後、除外基準は、①腸瘻造 設をしなかった患者、②胃拳上再建以外の再建方 法、③虫垂炎以外の消化管手術の既往歴がある、 ④その他の消化管手術と同時に施行した症例、⑤ 乳製品や大豆、ゼラチンアレルギーのある患者、 ⑥術前の段階で頻回の下痢をしている患者、と した。術後2日目から栄養瘻チューブより10ml/ hで栄養剤持続投与を開始、レントゲンや全身状 態を確認しながら毎日10ml/hずつ増量し、7日 目(60 ml/h)まで増量する。下痢を一日6 回以 上認めた場合には、栄養剤の減量、変更・中止す る。主要評価項目は下痢発生頻度、栄養剤投与 完遂率、副次評価項目は術後合併症、栄養状態 評価 (Rapid turnover proteins, CONUT score: The Controlling Nutritional Status score, PNI: Prognostic nutritional index)、採血データ、体 組成評価(体脂肪量・骨格筋量等)とした。なお、

PNIは  $(10 \times \text{Alb}) + (0.005 \times \text{末梢総リンパ球数}$  (TLC)) にて算出した。またCONUT score は、血清アルブミン値、総リンパ球数、総コレステロール値をそれぞれスコア化した。

#### 【結果】

手術時間はMEIN群で有意に延長していた (575.5 vs. 541.0 min. p = 0.006)。その他、背景 因子に差は認められなかった。術後合併症は、 MEIN群で頸部リンパ廔が多く見られた(3.0% vs. 20.6 %, p = 0.027) が、その他は有意な差は 認められなかった。下痢の発生頻度は、HINE 群で有意に低かった (21.2 % vs. 61.8 %, p= 0.001)。それに伴い、整腸剤の使用頻度も有意差 は見られなかったものの、HINE群で少ない傾向 が見られた (12.1 % vs. 29.4 %, p= 0.082)。 栄 養剤完遂率に関しては、HINE群が有意に高値で あった (97.4 % vs. 86.6 %, p= 0.002)。 術後6か 月でのCONUT scoreではHINE群で有意に低値 であり、栄養状態改善を認めた (p=0.030) (図 1a)。PNIは両群で差は認められなかった(図 1b)。他の血液データ所見の結果を図2に示す。 6か月目の総蛋白はHINE群で有意に高値を示し た (p=0.023) が、その他の栄養指標に関しては 両群で有意差は認められなかった。また体重変化 や体組成の変化(体脂肪率、骨格筋量)に関して も差は認められなかった(図3)。



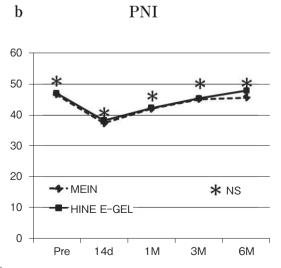
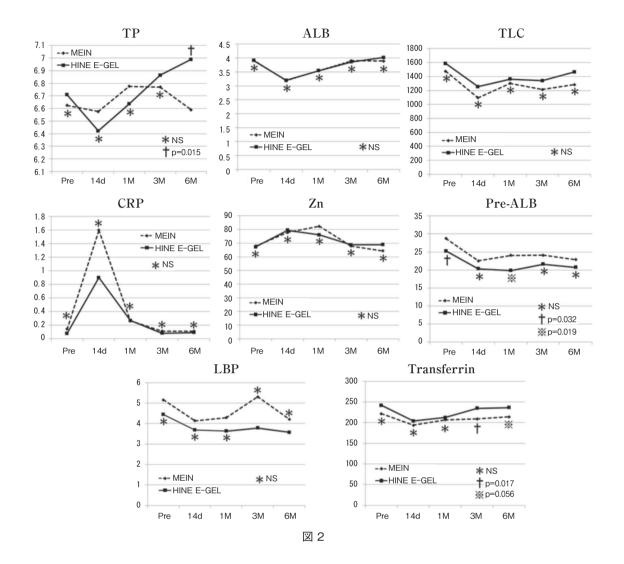


図 1



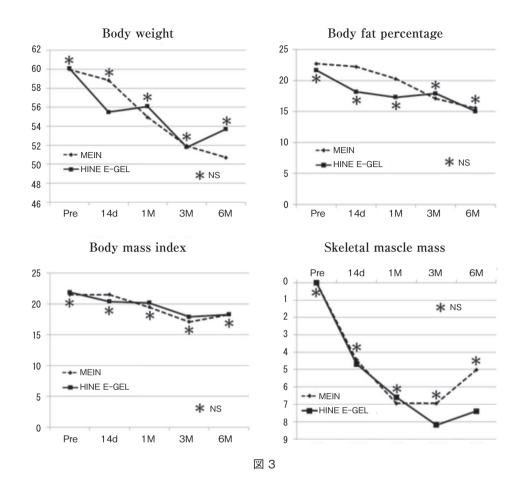
#### 【考察】

本検討から、ハイネイーゲル®はメイン®と比較し、下痢を減少させ、術後栄養剤投与計画に沿った栄養剤投与を可能にした。さらに、術後長期にわたり、免疫賦活栄養剤であるメイン®と同程度もしくは指標によっては良好な栄養状態が得られることが分かった。

まず、Bristolスケール<sup>10)</sup>でみた術後の下痢の発生頻度に関して、ハイネイーゲル<sup>®</sup>で有意に下痢が減少した。またそれに伴い、ハイネイーゲル<sup>®</sup>は高い栄養剤投与完遂率が得られることが分かった。経腸栄養剤での下痢の原因として、高

濃度の経腸栄養剤投与、投与速度、栄養剤の温度、細菌繁殖、食物繊維含有の有無が挙げられている<sup>11)</sup>。本研究での2剤の下痢の差は、まず浸透圧や濃度の違いが考えられる。メイン<sup>®</sup>の浸透圧は600mOsm/Lであり、濃度としては1kcal/mlであるのに対し、ハイネイーゲル<sup>®</sup>はそれらが360mOsm/Lと0.8kcal/mlであり、ハイネイーゲル<sup>®</sup>の方がいずれも低値である。

また、一般的に食物繊維が多く入っている方が下痢の軽減には有利とされている。メイン<sup>®</sup>は200 ml あたり3.6gの食物繊維が含まれているのに対し、ハイネイーゲル<sup>®</sup>では、200 ml あたり



2.2gと食物繊維の量としてはメイン®よりも含有量は少ない。しかしながら、ハイネイーゲル®で下痢が少なかった原因は食物繊維の種類であると考えられる。一般的に栄養剤には水溶性食物繊維である難消化性デキストリンが使用されているのに対し、ハイネイーゲル®は植物から精製されたペクチンを使用している。ペクチンは高分子量多糖類であり、腸内の内容物と複合物を形成して腸内の通過時間を長くし、腸が水分を吸収する時間が長くなることで便に含まれる水分が減少するため下痢が抑制されると考えられている12-14。

こうした下痢の減少や栄養剤投与を完遂させ、より効率的な栄養剤投与を行なうことにより、中長期的な栄養状態の指標として採血や体組成評価においても免疫賦活栄養剤であるメイン®と同等の成績を示した。さらに消化管手術後は、消化管

機能が低下し栄養剤の吸収効率が落ちる。そのため、メイン®のような半消化態栄養剤よりも、消化管への負担が少なくなる消化態栄養剤や成分栄養剤の方が、吸収効率の観点からも良好である可能性が考えられる<sup>15)</sup>。

#### 【結語】

食道癌術後に消化態栄養剤であるハイネイーゲル®を投与することで、メイン®よりも下痢の頻度を抑えることができた。また、それに伴い、免疫賦活栄養剤であるメイン®と同程度の栄養状態を維持することができたことから、食道癌術後の経腸栄養剤としてハイネイーゲル®も選択肢の一つとなりえるだろう。

#### 【文献】

1. Waldhausen J, et al.: Gastrointestinal myoelectric and clinical patterns of recovery

- after laparotomy. Ann Surg 211: 777-785, 1990
- Mochizuki H, et al.: Mechanism of prevention of postburn hypermetabolism and catabolism by early enteral feeding. Ann Surg 200: 297-310, 1984
- Moore FA, et al.: Early enteral feeding, compared with parenteral, reduces postoperative septic complication. Ann Surg 216: 172-183, 1992
- 4. Kudsk KA, et al.: Enteral versus parenteral feeding. Effects on septic morbidity after blunt and penetrating abdominal trauma. Ann Surg 215: 503-513, 1992
- Sato Y, et al.: Early postoperative enteral nutritional support after esophageal cancer surgery -study of the fat-containing high liquid diet-J. New Rem & Clin 65: 335-345, 2016
- Aiko S, Yoshizumi Y, Sugiura Y, et al.: Benefical effects of immediate enteral nutrition after esophageal cancer surgery. Surgery Today 31: 971-978, 2001
- Mimatsu K, Fukino N, Ogasawara Y, Saino Y, Oida T: Effects of Enteral Immunonutrition in Esophageal Cancer. Gastrointest Tumors DOI: 10.1159/000481797, 2017
- 8. Kitagawa H, Namikawa T, Yatabe T, Munekage M, Yamasaki F, Kobayashi M, Hanazaki K: Effects of a preoperative immune-modulating diet in patients with esophageal cancer: a prospective parallel group randomized study. Langenbecks

- Arch Surg 402: 531-538, 2017
- 9. Kaido T, Mori A, Ogura Y, Hata K, Yoshizawa A, Iida T, Yagi S, Uemoto S: Impact of enteral nutrition using a new immunemodulating diet after liver transplantation. Hepato-Gastroenterology 57: 1522-1525,2010
- O'Donnell LJD, Virjee J, Heaton KW: Detection of pseudodiarrhoea by simple clinical assessment of intestinal transit rate. Br Med J 300: 439-440, 1990
- 11. Martinez AO, Martinez VME. Proteins and peptides in enteral nutrition. Nutr Hosp 2: 1-13. 2006
- Rao TP, Hayakawa M, Minami T, et al.: Post-meal perceivable satiety and subsequent energy intake with intake of partially hydrolysed guar gum. Br Nutr 113: 1489-1498, 2015
- Jenkins DJA, Wolever TMS, Leeds AR, et al.: Dietary fibres, fibre analogues, and glucose tolerance: Importance of viscosity. Br Med L 1: 1392-1394, 1978
- Alyce AS, Brenda AH, Rosellen T, Donna EG, Micheline W: Effects of pectin on diarrhea in critically ill tube-fed patients receiving antibiotics. American J of Critical care 9: 403-411, 2000
- 15. Farrell JJ: Digestion and absorption of nutrients and vitamins. In: Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH, Eds. Sleisenger &Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management, 7th ed. Philadelphia; Saunders; 2002

# 蛍光イメージングと逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法を用いた術後残肝機能の解明

河口 義邦、伊藤 大介、小林 祐太、國土 典宏 東京大学肝胆膵外科

#### 【要約】

- ①ラットの肝静脈閉塞(VO)モデルを作成し、ICG蛍光顕微鏡および逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)法を用いて、VO領域におけるミクロレベルでの血流動態、肝機能評価を行った。
- ②20匹のFisher系雄ラットの左外側区域の肝静脈を6-0ナイロン糸にて結紮後、12時間後・24時間後・3日後・7日後に各々5匹ずつ(計20匹)再開腹し、VO領域および非VO領域から肝臓組織を採取した。
- ③凍結切片を作成しICG蛍光顕微鏡でICGの取り込み能を蛍光強度から測定したところ、VO領域のICG顕微鏡像による蛍光強度は、非VO領域と比較し低下していた。
- ④ VO 領域と非 VO 領域の Albumin・CYP1 A 2・CYP3 A 1・CYP7 A 1・GCLC の遺伝子発現量をRT-PCR法を用いて比較したところ、VO 領域の遺伝子発現量は、いずれの遺伝子においても12時間後から7日後にかけて70-90%まで漸増する傾向を認めた。
- ⑤組織学的にはVO領域では、中心静脈中心に 壊死領域がみられており、12時間後・24時間後・ 3日後・7日後でそれぞれ、全視野の0%, 35%, 70%, 70%認めた。
- ⑥VO領域は12時間の時点で肝機能の低下が 示唆されるが、その後漸増し7日後には70-90% 程度にまで上昇しており肝機能が改善しているこ とが示唆された。

#### 【目的】

3D-CTの進歩により肝静脈閉塞(VO)領域の容積を術前に正確に評価できるようになった<sup>1)</sup>。 先行研究によりヒトのVO領域における血流の取り込みが非VO領域の30-40%に低下していることをインドシアニングリーン(ICG)蛍光法を用 いて明らかにしたが、VO領域の肝機能の低下を示す証拠としては不十分と考えていた<sup>2,3)</sup>。そのため、ラットのVO閉塞モデルを作成し、ICG蛍光顕微鏡によるVO領域におけるミクロレベルでの血流動態および逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR) 法を用いた肝機能評価を行った。

#### 【方法】

Fisher系雄ラット(300-400g)を使用。開腹後、 左外側区域の肝静脈を6-0ナイロン糸にて結紮した。ICG蛍光法およびドップラーエコーで肝静脈が閉塞していることを確認し閉腹した。12時間後・24時間後・3日後・7日後に各々5匹ずつ(計20匹)再開腹し、VO領域および非VO領域から肝臓組織を採取した。1. 凍結切片を作成しICG蛍光顕微鏡でICGの取り込み能を蛍光強度から測定した。2. VO領域と非VO領域のAlbumin・CYP1A2・CYP3A1・CYP7A1・GCLCの遺伝子発現量をRT-PCR法を用いて比較した。3. 各切片を、HE染色を用いて組織学的評価を行った。【結果】

1. VO領域のICG顕微鏡像による蛍光強度は、非VO領域と比較し低下していた(12時間後: 54.7 ± 9.8%、24時間後: 54.7 ± 9.8%、3日後: 65.4 ± 4.2%、7日後: 86.9 ± 6.6%、図1)。2. VO領域の遺伝子(Albumin・CYP1A2・CYP3A1・CYP7A1・GCLC)発現量は、いずれの遺伝子においても12時間後から7日後にかけて漸増する傾向があり、12時間後・24時間後・3日後・7日後でそれぞれ、非VO領域の12-32%、23-43%、33-45%、67-91%であった(図2)。3. 組織学的にはVO領域では、中心静脈中心に壊死領域がみられており、12時間後・24時間後・3日後・7日後でそれぞれ、全視野の0%、35%、70%、70%に認めた。

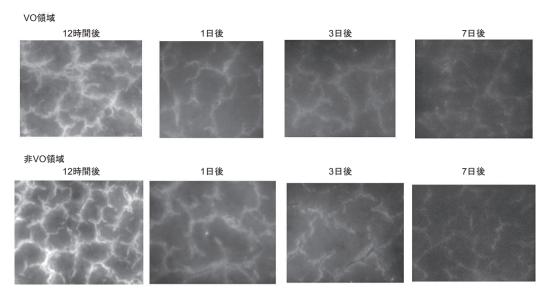


図 1 VO領域および非VO領域におけるICG蛍光顕微鏡像の経時的推移

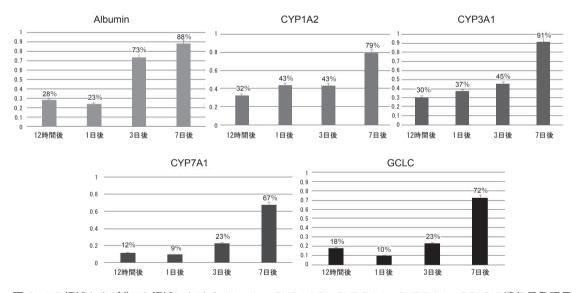


図 2 VO領域および非VO領域におけるAlbumin・CYP1A2・CYP3A1・CYP7A1・GCLCの遺伝子発現量

#### 【考察】

VO領域は発生してから12時間の時点では Albumin合成、薬物代謝、脂質代謝、グルクロン酸抱合と関連する遺伝子発現量が低下し肝機能の低下が示唆されるが、その後漸増し7日後には70-90%程度にまで上昇しており肝機能が改善することが示唆された。

#### 【文献】

- 1. Sano K, Makuuchi M, Miki K, Maema A, Sugawara Y,Imamura H, et al.: Evaluation of hepatic venous congestion: proposed indication criteria for hepatic vein reconstruction. Ann Surg 236: 241-247, 2002
- 2. Kawaguchi Y, Ishizawa T, Miyata Y, Ya-

- mashita S, MasudaK, Satou S, et al.: Portal uptake function in veno-occlusive regions evaluated by real-time fluorescent imaging using indocyanine green. J Hepatol 58: 247–253, 2013
- 3. Hashimoto T, Miki K, Imamura H, Sano
- K, Satou S, Sugawara Y, et al.: Sinusoidal perfusion in the veno-occlusive region of living liver donors evaluated by indocyanine green and near-infrared spectroscopy. Liver Transpl 14: 872-880, 2008

# ゲノム編集による胃癌肝転移関連分子 ethanolamine kinase 2の機能解析と分子標的治療への応用研究

神田 光郎 名古屋大学医学部附属病院消化器外科二

#### 【背景と目的】

胃癌の肝転移は極めて予後不良であり、その治 療方略の確立のためには新規分子標的治療薬の開 発および悪性度診断マーカーが不可欠である。原 発巣より遊離した癌細胞が遊走・生着・増殖して 肝転移巣を形成するまでには多段階の過程が必要 であり、遠隔転移の様式に応じた分子生物学的背 景を解明していくことが効果的アプローチとなる と考えた。我々は、肝転移形成に特異的に関与す る新規標的分子を同定する目的で、肝転移症例を 対象としたTranscriptome解析を行い、胃組織お よび肝転移巣の間で網羅的遺伝子発現比較を行っ た。肝転移再発症例で著明な発現亢進を認める遺 伝子としてethanolamine kinase 2 (ETNK2) を 検出した。本研究では、ETNK2遺伝子の詳細な 発現および機能を解析することを目的とした。 【方法】

in vitro実験;10種の胃癌細胞株に対して、84のEMT関連分子、細胞増殖およびアポトーシスに関与する主要pathway関連遺伝子の発現をPCR arrayで網羅的に定量し、ETNK2発現レベルとの相関性を解析した。ETNK2の高発現胃癌細胞株に対して、CRISPR/Cas9 protein法によるゲノム編集を行い、シングルセルクローニングによりノックアウト(KO)株を作成した。ETNK2-KO株と親株の間で増殖能、浸潤能、遊

走能の差を調べた。

in vitro実験;マウス皮下腫瘍モデルにおけるETNK-KO株と親株の造腫瘍能を比較した。ETNK2の発現解析;200例の胃癌症例から得た胃癌組織中ETNK2発現解析を、主に定量的real time PCR法を用いて行い、病期、再発形式との相関性を調べた。

#### 【結果】

#### 1. Transcriptome解析によるETNK2の同定

新たな標的分子となりうる胃癌肝転移関連分子を同定すべく、根治切除後に5年無再発、肝転移再発、腹膜播種再発、リンパ節再発のいずれかをきたした胃癌症例各4例の原発巣組織を対象に、次世代シーケンサー HiSeq(Illmina社)を用いてTranscriptome解析を行った。その結果、肝転移再発症例のみで有意に胃原発巣で発現亢進している遺伝子として、細胞外基質蛋白をコードするETNK2を検出した(表1)。

#### 2.胃癌細胞株におけるETNK2発現

胃癌細胞株を対象としたETNK2発現量とPCR arrayによる網羅的発現解析から、ETNK2発現レベルは肝転移に嗜好性の高いとされる高分化型胃癌細胞株(AGS, MKN1, MKN7, MKN74, N87)で高く、また癌の転移過程において重要な上皮間葉移行関連分子であるTGFB1, AHNAK, MMP9, CALD1, FN1の発現と有意な正の相関

表 1

	肝転移再発群		腹膜播種	重再発群	リンパ節再発群	
	VS		vs		VS	
	無再発群		無再発群		無再発群	
ETNK2	log <sub>2</sub>	p値	log <sub>2</sub>	p値	log <sub>2</sub>	p値
EINKZ	2.42	0.0003	-0.60	0.3672	1.39	0.0848

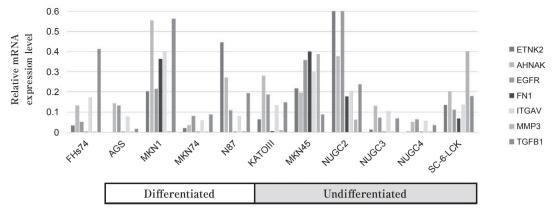


図 1 胃癌細胞株におけるETNK2と関連分子の発現度

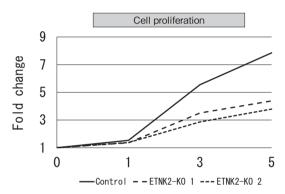


図 2 ETNK2ノックアウトによる胃癌細胞の 浸潤能の変化

関係を有することが示された(図1)。

3. ゲノム編集によるETNK2-KOの胃癌細胞機 能への影響

ETNK2-KO株では親株 (コントロール) と比較して著明に細胞増殖能 (**図2**)、遊走能 (**図3**)、浸潤能 (**図4**) のいずれもが低下していた。

4. マウス皮下腫瘍モデルでの造腫瘍能

マウス皮下腫瘍モデルでは、ETNK-KO株で 造腫瘍能が有意に低下していた(図5)。

5. 臨床検体における胃癌組織中ETNK2発現の意 義

胃癌切除標本から得た臨床検体200例における ETNK2発現解析では、胃癌原発巣でのETNK2 mRNA発現度は、肝転移を有する症例で高度に 上昇していた。また、胃癌原発巣のETNK2高発

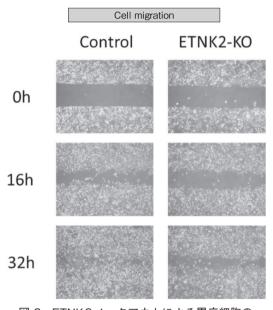


図3 ETNK2ノックアウトによる胃癌細胞の 遊走能の変化

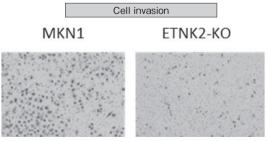


図 4 ETNK2ノックアウトによる胃癌細胞の 浸潤能の変化

#### マウス皮下腫瘍モデル

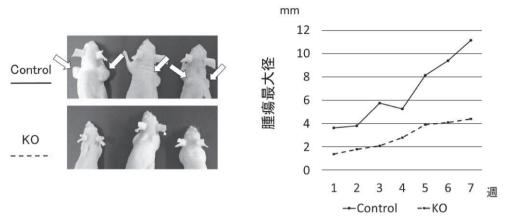


図 5 マウス皮下腫瘍モデルにおける造腫瘍能の比較

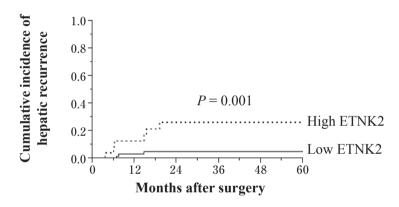


図 6 ETNK2発現度による術後累積肝再発率の比較

現群では術後肝再発率が有意に上昇していた(**図** 6)。

#### 【まとめ】

今回の成果によりETNK2は胃癌細胞の悪性 度、進展に関与することが示された。個別化治療 実現に向けての胃癌肝転移特異的分子標的治療薬 開発の基盤としたい。この場をお借りして、研究 助成をいただいた冲中記念成人病研究所の関係各 位に深く御礼を申し上げます。

## 中鎖脂肪酸による非アルコール性脂肪性肝炎に起因する 肝発癌の抑制

## 河野 寛 山梨大学第一外科

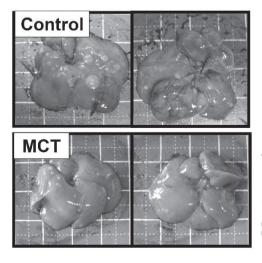
#### 【要約】

目的:中鎖脂肪酸(MCT)によるジエチルニトロサミン(DEN)投与肝発癌抑制効果を検討した。

方法:検討 I: 雄性C3H/HeN種マウス生後 14日目にDENを腹腔内投与(20 mg/kg)し 化学肝発癌モデルを作製し、MCT(C=8、octanate)を添加した食餌、あるいは通常餌 [脂肪成分はコーン油( $\omega=6$ ;リノール酸を主成分とする)を自由摂取させ、肝発癌率、腫瘍数、腫瘍最大径について2群間で比較検討した。また肝組織における炎症性サイトカインならびにケモカインの発現を検討した。

検討Ⅱ:中鎖脂肪酸投与による腹腔内脂肪への 影響を検討する目的で、採取した腹腔内脂肪組 織を病理組織学的に形態評価した。また、脂肪 抽出液中のadipocytokine 発現程度を比較検討 した。

結果:検討 I: Control群(通常餌)と比較し、MCT群で肝における腫瘍数、腫瘍最大径は低値を示した。また4-hydroxynonenal免疫組織染色では、MCT群における染色陽性率は減少し、脂質過酸化反応が抑制されていることが示唆された。肝組織における TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、MCP-1、MIP-2の発現はMCT群において Control群と比して減少を認めた。



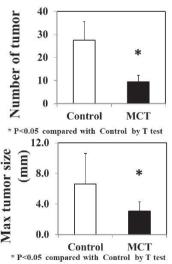


図 1

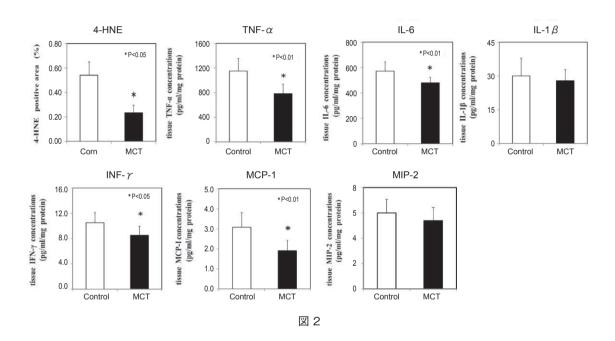
検討 II:MCT群ではControl群に比して、有意に体重増加の抑制が認められた。腹腔内脂肪組織の病理組織学所見では、脂肪細胞の肥大化が抑制され、一視野あたりの細胞数増加を認めた。また脂肪組織におけるadiponectin、leptin発現は、MCT群において増加を認めた。

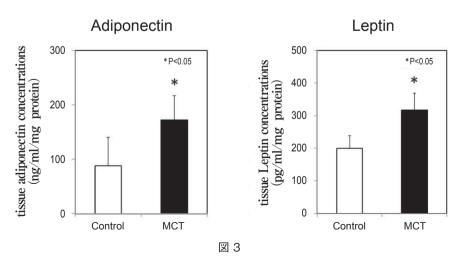
検討Ⅲ:血漿中ケトン体 (β-HB) 濃度は MCT群で増加を認めた。β-HBを添加した MH134細胞の共培養では、β-HB添加群にお いてDay3、Day7ともに細胞数の増加抑制が 認められた。

考察: MCT は肝臓での抗炎症ならびに抗酸化ストレス作用、脂肪組織でのadipocytokineの発現増加、またMCT代謝産物であるケトン体によるの抗腫瘍効果により肝癌の増殖過程を抑制することが示唆された。

#### 【背景】

肝臓のマクロファージである Kupffer 細胞は肝





類洞に存在し、貪食能による異物除去、活性酸素 や炎症性サイトカインなどのメディエーター産生 能、抗原提示能など種々の働きを有しており、炎 症性免疫機構において非常に重要な役割を果たし ている。しかし、一方でその過剰な活性化は宿主 にとって有害であり臓器障害を引き起こすことが 知られている1)。(申請者らはこれまで様々な肝 疾患の病態におけるKupffer細胞の働きについて 動物モデルを用いて検討してきた。Kupffer細胞 の抑制物質である塩化ガドリニウム (GdCl<sub>3</sub>) を 用いた検討においてKupffer細胞の過剰な活性化 抑制がラット致死量エンドトキシン投与モデルに おける致死率の有意な改善と多臓器障害発症を抑 制する事実を報告し、肝臓が炎症性免疫機構の中 枢臓器である事実を解明した<sup>2,3)</sup>。この検討にお いて、GdCl<sub>3</sub>投与ラットから得られたKupffer細 胞は形態的に主にsmall Kupffer細胞(M1マク ロファージ;炎症性)で、GdCl3の効果はlarge Kupffer細胞(M2マクロファージ; 抗炎症性)の 減少であることが理解された4)。さらに、ラッ ト腹膜炎モデルにおける検討では、M2タイプの Kupffer細胞の抑制による抗炎症性サイトカイン の減少により肺障害と致死率が増悪する事実も報 告した<sup>5)</sup>。一方、NAFLDにおいては、その病態 進行に伴い、肝臓でM2マクロファージの減少と M1炎症性マクロファージの増加により炎症性サ イトカイン産生が亢進し、肝細胞壊死に伴う線維 化が惹起されると報告されている。このように、 マクロファージ機能は炎症の病態により、各臓器 のマクロファージの働きが異なる。

MCTには抗炎症性免疫作用増強(IgAの発現増加)とマクロファージ由来の炎症性機構抑制作用を有することが既に解明されている。また、MCTは、消化管からの吸収が4倍早く、ミセル形成が無く門脈経由で直接肝臓に運ばれ、他の脂肪酸と比較し、肝細胞においてカルニチン非存在下でケトン体に代謝され、エネルギー源となることが知られており、この特徴を生かして、現在、経腸栄養剤に使用されているが、最近の報告で、ケトン体食による腫瘍細胞増殖抑制効果が臨床症例で報告されている。これまで、中鎖脂肪酸(MCT)経胃投与が、慢性エンドトキシン血症の

病態に基づいたアルコール性肝障害をほぼ完全に 改善することをラット胃瘻モデルで報告してい る<sup>6)</sup>。さらに、エンドトキシン血症誘発肝障害の 改善と消化管保護増殖効果を報告した<sup>7)</sup>。その作 用機序の1つとして、肝マクロファージのLPS受 容体CD14発現抑制によるLPS感受性低下に基づ く活性化抑制を解明した。さらに、消化管での炎 症性免疫に関与する分泌型IgA発現増強効果に ついても報告した<sup>8)</sup>。

これらの報告に基づいて考察すると、MCT投与によるマクロファージ由来の炎症性抑制、炎症性免疫作用増強、肝内のケトン体増加による肝発癌ならびに腫瘍増殖抑制効果が期待できると考える。

#### 【目的】

今回、ジエチルニトロサミン(DEN)腹腔内投与による炎症性化学肝発癌動物モデルにおける、MCTによる肝発癌抑制効果を検討した。また、中鎖脂肪酸投与がもたらす炎症性サイトカイン等の抑制作用、腹腔内脂肪減少とそれに伴うadipocytokineの発現増強作用を検討した。さらに、MCTの代謝物質の1つであるケトン体 $\beta$ -Hydroxybutyrate( $\beta$ -HB)がもたらす直接的な抗腫瘍効果についても検討した。

#### 【方法】

検討 I: 雄性 C3H/HeN 種マウスを用いて、生後 14 日目にジエチルニトロアミン(DEN)を腹腔内投与(20 mg/kg)することで化学肝発癌モデルを作製し、MCT(C=8、octanate)を添加した食餌、あるいは通常餌 [脂肪成分はコーン油( $\omega=6$ ; リノール酸を主成分とする)]を自由摂取させ、DEN 投与後 28 週目に犠牲死とし、肝発癌率、腫瘍数、腫瘍最大径について 2 群間で比較検討した。採取した肝を用いて免疫組織染色を行い病理組織学的に比較検討した。また肝組織における炎症性サイトカインならびにケモカインの発現を ELISA 法により検討した。

検討』:中鎖脂肪酸投与による腹腔内脂肪への 影響を検討する目的で、採取した腹腔内脂肪組織 を病理組織学的に形態評価した。またELISA法 を用いて、脂肪抽出液中のadipocytokineの発現 程度を比較検討した。 **検討**  $\blacksquare$ : MCT の代謝産物であるケトン体の腫瘍細胞の増殖抑制効果を検討するため、マウス血漿中のケトン体  $\beta$  - HB 濃度を測定した。また、マウス肝細胞癌株 MH 134 細胞に  $\beta$  -HB を種々の濃度(0,200,2000  $\mu$  g/ml)で添加して共培養し、Day 3 ならびに Day 7 で細胞数を計測した。

#### 【結果】

検討 I: Control群(通常餌)と比較し、MCT 群で肝における腫瘍数、腫瘍最大径は低値を示した。病理組織学的所見においても、肝最大割面組織像で腫瘍数は低値を示し、肝腫瘍の増大も抑制されていた(図1)。また4-hydroxynonenal免疫組織染色では、MCT群における染色陽性率は減少し、脂質過酸化反応が抑制されていることが示唆された。肝組織におけるTNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、MCP-1、MIP-2の発現はMCT群においてControl群と比して減少を認めた(図2)。

検討 II:MCT群ではControl群に比して、有意に体重増加の抑制が認められた。腹腔内脂肪組織の病理組織学所見では、脂肪細胞の肥大化が抑制され、一視野あたりの細胞数増加を認めた。また脂肪組織におけるadiponectin、leptin発現は、MCT群において増加を認めた(図3)。

**検討町**: 血漿中ケトン体( $\beta$  -HB)濃度はMCT 群で増加を認めた。 $\beta$  -HBを添加したMH134細 胞の共培養では、 $\beta$  -HB添加群においてDay 3、 Day 7 ともに細胞数の増加抑制が認められた。

#### 【考察】

DEN投与による化学肝発癌モデルにおいて、MCT投与群では腫瘍の発生数、腫瘍サイズが有意に減少した結果より、MCT投与が発癌ならびに腫瘍増殖・進展に抑制に関与していることが示唆された。その機序としてMCT投与群において、種々の炎症性サイトカイン発現抑制結果ならびにマクロファージの活性化関連ケモカインの発現抑制結果より、MCTのマクロファージを介した抗炎症作用が長期的に肝組織の慢性炎症を改善し、腫瘍増殖抑制に繋がったと考えられた。また脂質過酸化反応も有意に抑制されており、肝慢性炎症を起因とする酸化ストレスの軽減も集学的に腫瘍増殖を抑制したと考えられた。腹腔内脂肪組

織の減少に伴い脂肪細胞の増殖が適正化されることで、有意なadipocytokine 発現の増加が認められ、これが前述の抗炎症作用の補助的な働きに繋がったことも考えられた。また一方で、MCT代謝産物であるケトン体 $\beta$ -HBはMCT投与群において、血漿中で有意な増加を認め、さらも、マウス肝細胞癌株MH134細胞と $\beta$ -HBの共培養で、その増殖を有意に抑制したことから、MCTの代謝産物であるケトン体が直接的に癌細胞のエネルギー代謝を抑制し腫瘍増殖抑制作用を有することが示唆された。

#### 【結論】

マウス化学物質肝発癌モデルにおけるMCT投与は、肝臓での抗炎症ならびに抗酸化ストレス作用、脂肪組織でのadipocytokineの発現増加、またMCT代謝産物であるケトン体による抗腫瘍効果により肝癌の増殖過程を強く抑制することが示唆された。本検討をもとにして、肝細胞癌や他の消化器癌の担癌状態に対するMCT付加による栄養免疫効果を考慮した治療への臨床応用を検討したいと考えている。

#### 【文献】

- Kohno H,et al.: The role of splenic macrophages in plasma tumor necrosis factor levels in endotoxemia. Eur Surg Res 29: 176-186, 1997
- Kono H, et al.: Gadolinium chloride prevents mortality in hepatectomized rats given endotoxin. J Surg Res 96: 204-210, 2001
- Iimuro Y, Kohno H, et al.: Blockade of liver macrophages by gadolinium chloride reduces lethality in endotoxemic rats-analysis of mechanisms of lethality in endotoxemia. J Leukoc Biol 55: 723-728, 1994
- Kono H, et al.: Functional heterogeneity of the kupffer cell population is involved in the mechanism of gadolinium chloride in rats administered endotoxin. J Surg Res 106: 179-187, 2002
- 5. Kono H, et al.: The Kupffer cell protects against acute lung injury in a rat peritonitis model: role of IL-10. J Leukoc Biol 79: 809-

817, 2006

- Kono H, et al.: Medium-chain triglycerides inhibit free radical formation and TNFalpha production in rats given enteral ethanol. Am J Physiol 278: G467-G476, 2000
- 7. Kono H, et al.: Protective effects of mediumchain triglycerides on the liver and gut in
- rats administered endotoxin. Ann Surg 237: 246-255, 2003
- Kono H, et al.: Medium-chain triglycerides enhance secretory IgA expression in rat intestine after administration of endotoxin. Am J Physiol 286: G1081-G1089, 2004

## (9) 乳腺・内分泌外科疾患

## ホルモン受容体陽性HER2受容体陰性乳癌の晩期再発 予測因子と長期予後の検討

田村 官子、川端 英孝

#### 【背景】

乳癌に対する周術期の薬物療法の標準化、特に 再発高リスクであると考えられているホルモン受 容体陰性もしくはHER2受容体陽性例に対して標 準的に化学療法・抗HER2療法を行うことで再発 率の低下が認められてきた。しかし予後良好であ ると考えられているホルモン受容体陽性・HER2 受容体陰性乳癌患者の再発の約半数は術後5年以 上の晩期再発であり、乳癌全体の予後の改善が認 められた今、晩期再発の予測因子の解明とともに 晩期再発例に対する対策が求められている。再発 リスクの高い症例に対しては術後内分泌療法期間 の延長が予後改善に寄与することが示唆されてい るが、高容量化学療法が晩期再発にも寄与するか については検討が必要である。術後薬物療法とし て高容量の化学療法以外に、低用量の化学療法を 行うことにより血管新生を抑制し、がん細胞と血 管内皮細胞の相互作用を阻害することが示唆され ている。晩期再発は癌細胞の上皮間葉移行や血管 新生、免疫応答など相互作用により癌細胞が休眠 状態に陥っていることが示唆されている。晩期再 発の予測因子として、上皮間葉移行や腫瘍周囲間 質の活性化を示す遺伝子変異の報告が近年多く認 められているが、原発巣での検討が多くリンパ節 転移巣での検討は報告が少ない。再発高リスク群 に対し高容量化学療法と低用量化学療法、内分泌 療法が行われた本臨床試験の統合解析を行い、乳 癌早期・晩期再発のリスクと考えられる遺伝子変 異や5FU製剤の治療効果予測因子を原発巣なら びにリンパ節転移巣で検討を行い、また長期予後 を検討することでホルモン受容体陽性乳癌に対す る再発リスク低減目的での薬物療法の最適化に寄 与する結果が得られることが予測される。本検討

はホルモン受容体陽性・HER2受容体陰性乳癌に対する薬物治療と長期予後を検討し、晩期再発も含めた治療の最適化について遺伝子発現の有無と長期予後を検討することが目的である。

#### 【検討1】

商用化されている予後予測・治療効果multigene assayの実臨床での意義。

#### 【対象】

当院で2007年から2015年10月までにOncotype  $Dx^{\$}$ を施行した(wODX)250症例の臨床病理学的因子と予後について検討した。更に同時期に手術先行で治療されたODX適応症例(閉経前pN0、閉経後pN0、1)のうちODX施行せず(w/oODX)治療方針が決定された306例を対象としpropensity score (PS)を用いてマッチし予後比較を行った。

#### 【結果】

wODX 250例の臨床病理学的因子は年齢: 27-75才 (中央值49)、pTsize: 2-60m (15mm)、 pN: 転移なし; 183例、あり; 67例、HG1; 80例、 /HG2、3; 170例、NG1; 159例/NG2、3; 91例、 ER: AS>=7; 240例、AS<7; 10例、PgR: AS>=7; 147 例、AS<7: 103 例、Ki 67: >= 20 %: 65 例 /<20%; 182例; 不明2例、RS (TALORx分類) : low (<11, L); 47例、inter (11-24, I); 170例、 high (>24, H); 33例、薬物治療: 化学療法施行例 (wCT): 37例、化学療法非施行例(w/oCT): 213 例であった。中央観察期間は4.6年、観察期間内 の再発症例は13例(5.1%)、4yDFSはH; 92.1%、 I; 96.6%、L; 100%であった (OR H; 9.8×108、 I:  $6.7 \times 108$ , L: Ref: 95%CI 1.05-5.9: p=0.05) wODX 250例とw/oODX; 306例の臨床病理学的 因子をPSを用いてマッチさせた342例(1:1)に

ついて予後比較を行ったところ4yDFSはwODX-wCT群; 89%、wODX-w/oCT群; 96.8%、w/oODX-wCT群; 100%、w/oODX-w/oCT群; 95.9%であった。0DXを用いてCT回避した症例は用いずにCT回避した症例に比べて予後が良い傾向が認められた(p=0.2)。

#### 【考察】

ODXは社会背景にも影響を受けその予後に対する影響を実臨床で検討することは困難である。今回PSを用いて背景因子をマッチさせることでODX施行しCT回避を選択した症例は未施行でCT回避するより予後が良いことが示唆され実臨床の症例を用いてODXの臨床意義が確認できた。

#### 【検討2】

乳癌の悪性化に関わるTRIM44の標的因子の探索と同定。

#### 【背景】

TRIM(Tripartite motif)(図1)ファミリー蛋白質は我々が同定したEfp/TRIM25<sup>1)</sup>をはじめ、RINGフィンガー型ユビキチンE3リガーゼとして機能するものが多く、免疫系や癌化への関与が明らかになりつつある。このうちTRIM44はRINGフィンガードメインを欠く非定型的なTRIMファミリー蛋白質であり、非小細胞性肺癌、食道癌、胃癌等で高発現する報告が近年なされ、癌での役割が注目されているが、乳癌での意義は明らかではない。

#### 【対象と方法】

研究の同意が得られた手術先行の浸潤性乳癌129例(2006年10月~2012年7月)を対象とし、手術検体を用いて免疫組織学的評価を行い、TRIM44抗体の免疫反応性と臨床的諸因子および予後との関連を検討した(施設IRB番号845/13-

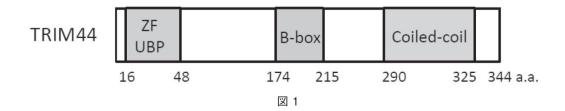
148)。さらに乳癌細胞株のMCF-7及びMDA-MB231を用いてTRIM44の機能解析を行い、マイクロアレイおよび定量的RT-PCR法を用いてTRIM44の標的遺伝子の探索を行った。

#### 【結果】

TRIM44の免疫反応性は乳癌患者の核異型度 と正の相関を認め (P = 0.033)、TRIM 44の強 い 免疫反応性は予後不良因子として有意に患者 の無再発生存率に (P = 0.031)、生存率 (P = 0.027) と相関を認めた。また多変量解析におい てTRIM44のステータスは無再発生存率 (P= 0.005)、生存率(P = 0.002)の独立した予後予 測因子であった。siRNAを用いたTRIM44のノ ックダウンにより MCF-7及び MDA-MB-231 細 胞は有意に増殖が抑制され、またMDA-MB-231 細胞の運動能が抑制された。TRIM44の標的遺 伝子を探索するため、MDA-MB-231細胞に対 してsiTRIM44並びにsiControlを用いてマイク ロアレイ解析を行った。その結果により、候補 とされた遺伝子のmRNAレベルでの発現を定量 的RT-PCR法により調べたところ、TRIM44の ノックダウンにより腫瘍抑制的に働くとされる CDK 19 (cyclin dependent kinase 19)  $\mathcal{O}$  mRNA の発現が増加した。一方で、癌の増殖と転移に関 わるMMP (matrix metallopeptidase) ファミリ ーに属するMMP1のmRNAの発現が減少するこ とが示された。以上より、乳癌の悪性化に関わる TRIM 44の機能の少なくとも一部がこれらの標的 遺伝子を介したものである可能性が示唆された。

#### 【結語】

本研究によりTRIM44の免疫反応性が乳癌患者の予後因子となり得ることが示された。また乳癌の悪性化に関わるTRIM44の標的遺伝子の候補としてCDK19、MMP1が同定された。



### 【文献】

1. Malliri A, van der Kammen RA, et al.: Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are re-

sistant to Ras-induced skin tumurs. Nature 417: 867-871, 2002

## (10) 間脳下垂体疾患

### 非機能性下垂体腺腫におけるドパミンD2受容体発現の検討

#### 西岡 宏、山田 正三、井下 尚子

#### 【要約】

機能性下垂体腺腫の多くはドパミン受容体 (D2R) やソマトスタチン受容体 (SSTR) を発現 しており薬物治療に利用されている。これに対し 非機能性腺腫は薬物治療が無効であるとされてき た。今回、非機能性腺腫をWHO組織型分類(2017) に基づき分類しD2R、SSTR2AとSSTR5の発現 を免疫組織化学的に検索した。対象は非機能性腺 腫117例。D2R、SSTR2A、SSTR5は各々29例 (24.8%)、11例 (9.4%)、24例 (20.5%) に陽性 であった。組織型別にはゴナドトロピン腺腫84例 と比較し、Pit-1系腺腫 (Pit) 19例はSSTR2A とSSTR5の発現が有意に高く(各々 P=0.0003、 P<0.0001)、逆にサイレントACTH腺腫9例では SSTR2A発現が低かった (P=0.0487)。Pit は機 能性Pit-1系腺腫 (GHやTSH産生腺腫) と同様 にソマトスタチン誘導体による薬物治療が有効な 可能性があると考えられた。一方、D2Rの発現 は症例間でばらつきが大きく組織型による違いは 認められなかった。非機能性腺腫に対するこれら の受容体発現の検索は、今後の薬物治療の可能性 を検討する上でとても重要である。

#### 【目的】

機能性下垂体腺腫であるプロラクチン産生腺

腫、GH産生腺腫、TSH産生腺腫およびACTH 産生腺腫はドパミン受容体(D2R)やソマトス タチン受容体(SSTR)などを発現していること が多く薬物治療に利用される。これに対し臨床的 にホルモン過剰症状を呈さない非機能性腺腫は薬 物治療が通常無効である。

近年、非機能性腺腫は臨床像の異なる複数の組織型よりなることが明らかとなり、従来の前葉ホルモンに加えて下垂体前葉細胞の分化誘導に関与する転写因子の免疫組織化学を一部の症例に行なうことが新WHO組織分類で推奨された<sup>1)</sup>。今回、非機能性腺腫をこれに基づき分類しD2RおよびSSTRの発現を検索した。

#### 【対象と方法】

2017年に外科治療を行った非機能性下垂体腺腫連続 117例 (男性 67・女性 50、25-81歳)を対象とした。WHO組織型分類 (2017) に基づき、前葉ホルモン (GH, プロラクチン, TSH, ACTH, LH, FSH) と転写因子 (SF-1とPit-1) の免疫組織化学により組織分類した。各組織型におけるD2R (Santa Cruz社, B-10)、SSTR2A (Abcam社, ab134152)、SSTR5 (Abcam社, ab109465)の発現を免疫組織化学的に検索した (陽性所見を4段階評価し3+/2+を陽性、1+/-を陰性とした)。

表 1 ゴナドトロピン腺腫(Gn)、サイレントACTH腺腫(SC)、サイレントPit-1系腺腫 (Pit) とナルセル腺腫(NC)におけるSSTR2A、SSTR5とD2Rの発現。

	SSTR2A	SSTR5	D2R
Gn (84)	14/5/12/53	1/1/15/67	4/13/46/21
SC (19)	0/0/0/19	1/0/4/14	1/2/11/5
Pit (9)	8/0/0/1	5/3/0/1	0/2/6/1
NC (5)	2/0/1/2	0/0/0/5	0/2/2/1

免役組織化学的4段階評価:3+/2+/1+/-(3+/2+は陽性.1+/-は陰性)

#### 【結果】

非機能性腺腫 117例はゴナドトロピン腺腫 (Gn) 84例、silent ACTH腺腫 (SC) 19例、Pit-1系腺腫 (Pit) 9例とナルセル腺腫疑い (NC) 5例に分類された。全117例の内、29例(24.8%)がSSTR2A陽性、11例 (9.4%) がSSTR5陽性であった。Gn84例と比較し、PitではSSTR2AとSSTR5の発現はともに有意に高く(各々P=0.0003、P<0.0001)、逆にSCではSSTR2A発現が有意に低かった (P=0.0487)。一方、D2Rの発現は全117例中24例 (20.5%) で認められたが、組織型による一定の傾向は認められなかった。

#### 【考察】

GH産生腺腫やプロラクチノーマだけでなく、一部の非機能性下垂体腺腫がSSTR2A、SSTR5やD2Rを発現していることは従来から報告されている<sup>2)</sup>。また受容体の発現だけでなく、ドパミン製剤が非機能性下垂体腺腫の増大抑制・縮小に有効だったとする症例報告も存在する。最近ではGreenmanら<sup>3)</sup>がドパミン製剤の非機能性腺腫の再発抑制効果を明らかにしており、また有効性とD2R発現の相関も報告している。これに対してソマトスタチン誘導体の非機能性腺腫に対する腫瘍抑制効果に関しては否定的な報告が多い<sup>4)</sup>。

今回の検索でも非機能性腺腫の一部がSSTRやD2Rを発現していることは確認できた。特にPit系の非機能性腺腫はSSTR2AとSSTR5を高発現しており、機能性Pit-1系腺腫(GH産生腺腫やTSH産生腺腫)と同様にソマトスタチン誘導体による薬物治療が有効な可能性がある。一方、今回のD2R免疫組織化学は症例間でばらつきが大きく一定の傾向は得られなかった。正確で簡便なD2R発現の検索手技が確立すればドパミン製剤

の有効例を明確に同定することができると考察される。非機能性腺腫に対するこれらの受容体発現の検索は、今後の薬物治療の可能性を模索する上で重要であり、さらに症例を重ねての検討が必要である。

#### 【文献】

- Nishioka H, Inoshita N, Mete O, Asa SL, Hayashi K, Takeshita A, Fukuhara N, Yamaguchi-Okada M, Takeuchi Y, Yamada S: The complementary role of transcription factors in the accurate diagnosis of clinically nonfunctioning pituitary adenomas. Endocr Pathol 26: 349-355, 2015
- 2. Nishioka H, Tamura K, Iida H, Kutsukake M, Endo A, Ikeda Y, Haraoka J: Co-expression of somatostatin receptor subtypes and estrogen receptor-alpha mRNAs by nonfunctioning pituitary adenomas in young patients. Molecular and Cellular Endocrinology 331: 73-78, 2011
- 3. Greenman Y, Cooper O, Yaish I, Robenshtok E, Sagiv N, Jonas-Kimchi T, Yuan X, Gertych A, Shimon I, Ram Z, Melmed S, Stern N: Treatment of clinically nonfunctioning pituitary adenomas with dopamine agonists. Europ J Endocrinol 175: 63-72, 2016
- Colao A, Filippella M, Di Somma C, Manzi S, Rota F, Pivonello R, Gaccione M, De Rosa M, Lombardi G: Somatostatin analogs in treatment of non-growth hormone-secreting pituitary adenomas. Endocrine 20: 279– 283, 2003

## (11) 泌尿器疾患

リンチ症候群を背景と考えられる泌尿器癌(上部尿路上皮癌・ 前立腺癌)の有病率の推定およびその臨床病理学的特徴の検討

浦上 慎司、井下 尚子、岡 優、岡根谷 利一

#### 【要約】

目的:リンチ症候群は、ミスマッチ修復関連 (MMR) 遺伝子の生殖細胞系列変異を原因として、ミスマッチ修復機構が損なわれ、大腸癌、子宮内膜癌、上部尿路上皮癌など様々な悪性腫瘍が発生する常染色体優性遺伝性疾患である。全大腸癌の2-5%がリンチ症候群と考えられており、その大腸癌の特徴については詳細な検討がなされているが、上部尿路上皮癌の臨床病理学的特徴については知られていない。また、最近ではリンチ症候群と前立腺癌との関連も指摘されている。今回我々はリンチ症候群を背景とするこれら泌尿器癌の有病率の推定およびそれらの臨床病理学的特徴について検討する。

対象と方法:当院で手術され上部尿路上皮癌および前立腺癌と診断された患者に対して、摘除組織内の腫瘍組織と正常組織を用い、リンチ症候群の原因遺伝子であるMLH1, MSH2, MSH6, PMS2のMMR蛋白発現をユニバーサルに免疫組織学的染色にて評価し、リンチ症候群が疑われる症例に対しては、遺伝子診断をすすめると同時にその臨床病理学的特徴を検討した。

結果:2006年から2014年の間に腎尿管全摘を施行された143例の上部尿路上皮癌と2012年から2013年に前立腺全摘を施行された60例の前立腺癌を対象とした。ユニバーサル免疫染色結果より、リンチ症候群を背景とする上部尿路上皮癌の有病率は5%(7例)と推定されたが、前立腺癌ではほとんどないと推定された。上部尿路上皮癌に関しては5/7症例でMSH2/MSH6のタンパク欠失パターンであった。そのうちの2例に遺伝子検査を実施し、いずれもMSH2遺

伝子のgermline mutationであった。これらの年齢の中央値は71歳。5症例は、上部尿路上皮癌が初発として発生しており、改訂ベセスダガイドラインを満たすものは2例しかなかった。その他の臨床的特徴としては7例中、女性5例、尿管癌5例、低悪性度7例、低浸潤度6例と多かった。病理学的には内反性乳頭腫に類似した異型の弱い尿路上皮癌が6例、茎が細く丈の高いvillousな乳頭状尿路上皮癌が4例にみられ、これらがリンチ症候群を背景とする上部尿路上皮癌の特徴的な組織型と思われた。

考察:本研究はMMR蛋白の免疫染色をユニバーサルに泌尿器科癌に対して施行した最初の報告である。リンチ症候群に関連すると考えられる上部尿路上皮癌患者の有病率は5%と意外に多いと推定されたが、前立腺癌では多くないと考えられた。リンチ症候群に関連すると考えられる上部尿路上皮癌は女性・尿管に多く、病理学的には低悪性度・低浸潤度で、特徴的な組織型を有しており、MSH2/6欠失パターンが多かった。本研究結果は、今後泌尿器科医へのリンチ症候群の啓蒙に役立つと考えられる。

#### 【目的】

リンチ症候群は、0.2%の頻度で認めるミスマッチ修復遺伝子 (MLH1、MSH2、MSH6、PMS2) の生殖細胞系列変異を原因とする常染色体優性遺伝性疾患であり、ミスマッチ修復機構が損なわれ、腫瘍制御システムやDNA損傷修復反応、アポトーシスに関わる遺伝子に変異が誘発され、大腸癌、子宮内膜癌を初め、卵巣癌、胃癌、小腸癌、胆道癌、膵癌、上部尿路上皮癌といった、多彩な関連悪性腫瘍が発生する<sup>1-3)</sup>。特に大腸癌

は、リンチ症候群の50%以上が発生する最も頻度の高い癌で、その疫学をはじめ、臨床病理学的特徴についても詳細な検討がなされており、大腸癌からリンチ症候群と診断された患者には、併発しうる他の関連癌に対するスクリーニングも行われ、早期診断・治療につながっている。

一方リンチ症候群の上部尿路上皮癌の発生率は5-28%で、一般集団と比較して約20倍の発生率で、3番目に頻度の高いリンチ症候群関連悪性腫瘍である<sup>4)</sup>。また最近では前立腺癌がリンチ症候群男性に時折併発することが知られており、大腸癌を有するリンチ症候群患者は一般集団の男性と比較して2.05倍前立腺癌に罹患しやすいとも報告され、前立腺癌とリンチ症候群との関連も推察されている<sup>5)</sup>。

しかし残念ながら、全大腸癌の2-5%がリンチ症候群であることが知られている一方<sup>6.7)</sup>、全上部尿路上皮癌あるいは全前立腺癌におけるリンチ症候群の占める有病率は不明で、その癌の臨床病理学的特徴についてもほとんど知られていない。その結果として、未だ泌尿器科医におけるリンチ症候群の認知度は極めて低く、泌尿器科癌を有するリンチ症候群の見落としが問題視されている。そのため、泌尿器癌の中からもリンチ症候群を正しく診断・把握することは、併発しうる他の悪性疾患の早期診断・治療につながるのみならず、その家系での癌の早期診断につながるため、極めて重要と考えられる。

したがって本研究では、当院におけるリンチ症候群を背景と考えられる泌尿器癌患者(上部尿路上皮癌、前立腺癌)の有病率を、後ろ向きにミスマッチ修復蛋白のuniversal immunohistochemical screeningにより推定し、その臨床的および病理学的特徴を検討する。

#### 【方法】

当院で手術を受け、病理学的に上部尿路上皮癌あるいは前立腺癌と診断され、同意が得られた全患者を対象として、MLH1, MSH2, MSH6, PMS2の4つのミスマッチ修復蛋白のuniversal immunohistochemical screeningを施行した。ホルマリン固定された検体のパラフィン包埋ブロックから腫瘍組織と正常組織を含む3μmの薄切切

片をスライドガラスに貼り付け、60℃で24時間 乾燥させ、マイクロアレイを作成。キシレンに て15分間脱パラフィンし、100%エタノールから 段階的に脱キシレン処理後、賦活化を行った。抗 原賦活処理は各々の抗体の取り扱い説明書にした がった。さらに内因性ペルオキシダーゼ活性除去 のため過酸化水素加メタノールを用いて、室温 で15分間インキュベートした後、一次抗体と反 応させた。各ミスマッチ修復タンパクに対する一 次抗体として、MLH1: Leica・PA0610 (希釈)、 MSH2: Leica·PA0048 (希釈)、MSH6: Leica· NCL-L-MSH6、PMS2: Leica・NCL-L-PMS2を 用いた。各々の希釈倍率はMLH1、MSH2は1:1、 MSH6、PMS2は1: 100とした。染色は、DAKO Envision (Agilent Technologies Dako, Glostrup, Denmark) を使用し、diaminobenzidine (SIGMA 社、St.Louis MO. USA) で発色させた。周囲の 正常組織における核の染色性をinternal control として上部尿路上皮癌部の染色性を泌尿器病理医 により評価し、明らかに腫瘍細胞の核で染色陰性、 隣接正常細胞および間質細胞で染色陽性の場合の みを染色結果「陰性」とした。

また、免疫染色結果「陰性」症例の臨床的特徴を検討し、泌尿器専門病理医により、免疫染色結果「陰性」症例のHE染色標本の病理学的特徴も併せて検討した。

さらに免疫染色結果「陰性」症例をリンチ症候群が背景と考えられる泌尿器科癌症例として、遺伝子カウンセリングを施行し、遺伝子診断を希望した症例には、協力施設においてリンパ球より DNA を抽出し、4つのミスマッチ修復遺伝子において、PCR ダイレクトシークエンスおよびMLPAにより遺伝子変異を分析した。

#### 【結果】

#### 1. 上部尿路上皮癌

2006年から2014年の間に当院で腎尿管全摘を施行され、同意が得られた、143例を対象とした。 症例の背景は表1に記した。なお23/143例(16%)が改訂ベセスダ基準を満たしていた。免疫組織学的染色を施行したところ7例(5%)にミスマッチ修復蛋白の欠失を認め、詳細を表2に記した。 MLH1/PMS2欠失パターン1例、MSH2/MSH6

表 1 上部尿路上皮がん患者背景

年齢		70歳(45 — 92)				
性別	男	101 (71%)				
1生かり	女	42 (29%)				
患側	右	74 (52%)				
忠则	左	69 (48%)				
部位	腎盂	71 (50%)				
마까	尿管	72 (50%)				
	1	16 (11%)				
Grade	2	89 (62%)				
	3	38 (27%)				
	а	25 (17%)				
	is	3 ( 2%)				
nΤ	1	38 (27%)				
рТ	2	23 (16%)				
	3	52 (36%)				
	4	2 ( 1%)				

欠失 パターン5例 (図1)、MSH6単独欠失パタ ーン1例であった。これらのうち2例のみが上部 尿路上皮癌の診断以前に大腸癌を発症していた。 その他5例は上部尿路癌が初発で、そのうち4例 は上部尿路癌以外の癌を合致していなかったが、 1例は上部尿路上皮癌診断後に胃癌・乳癌を発症 していた。5/7例は上部尿路上皮癌の診断時には 改訂ベセスダ基準を満たしておらず、アムステル ダム基準 Ⅱ を満たしていた症例は3/7症例(42%) のみであった。性別内訳は女性5例、男性2例で 女性に多かった。上部尿路上皮癌の発生年齢は 中央値71歳で、60歳未満での診断は52歳発症の 1例のみで、若年者は少なかった。左右差は関係 なかったが、腎盂癌: 尿管癌は2:5で、尿管癌で 多かった。全例 low grade tumor であり、6/7例 がpT1以下の浸潤度であった。免疫染色「陰性」 症例でのHE染色の病理学的特徴としては、内反 性乳頭腫に類似した異型の弱い尿路上皮癌を示 すもの (図2a) が6/7例に、茎が細く丈の高い

表 2 ミスマッチ修復蛋白免疫染色陰性症例一覧

症例	年齢(歳)	性別	患側	部位	Grade	рТ	癌既往歴	<ul><li>免染染色</li><li>タンパク発現</li><li>欠失パターン</li></ul>	病理像	遺伝子検査
1	71	女	右	尿管	low	а	Х	MSH6	Inverted growth pattern Villous pattern	未
2	72	男	左	腎盂	low	1	Х	MSH2/MSH6	Villous pattern	未
3	76	女	右	尿管	low	1	Х	MLH1/PMS2	Inverted growth pattern Villous pattern	未
4	61	女	左	尿管	low	1	○ 大腸癌	MSH2/MSH6	Inverted growth pattern	MSH2 IVS13-2A>G
5	77	女	右	尿管	low	а	○ 胃癌、大腸癌 のちに乳癌	MSH2/MSH6	Inverted growth pattern Villous pattern	未
6	62	女	左	尿管	low	2	X のちに胃癌、 子宮体癌	MSH2/MSH6	Inverted growth pattern	MSH2 exon1-6 del (MLPA)
7	51	男	左	腎盂	low	а	×	MSH2/MSH6	Inverted growth pattern	none
	中央値 71 歳	男:2 女:5	左:4 右:3	尿管 5/7	Low grade 7/7	pT1 以下 6/7	リンチ関連 腫瘍の既往 3/7	MSH2 and/or 6 欠損: 6/7	Inverted: 6/7 Villous: 4/7	

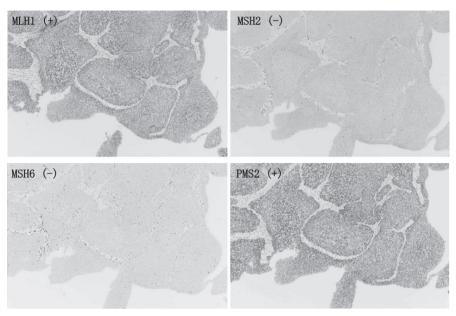


図 1 ミスマッチ修復蛋白欠失上部尿路上皮癌の免疫染色典型症例 MSH2/6 タンパクの欠失を認める。

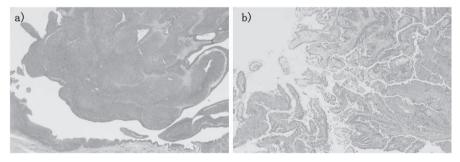


図 2 ミスマッチ修復蛋白欠失上部尿路上皮癌のHE染色典型症例 a) 内反性乳頭腫に類似した異型の弱い尿路上皮癌を認める。 b) 茎が細く、丈の高いvillousな乳頭状尿路上皮癌を認める。

villousな乳頭状尿路上皮癌を示すもの(図2b)が4/7例に認め、通常の上部尿路上皮癌とは異なり、特殊な組織型を示していた。

免疫染色「陰性」症例のうち、2例が原因遺伝子の遺伝学的検査の希望があり同意が得られた1例はMLPA法にて、MSH2遺伝子のエクソン1-6の欠損を認め、1例はダイレクトシークエンス法にて、イントロン13のスプライス・アクセプター部位のAからGへの単塩基置換を認めた。

#### 2. 前立腺癌

2012年から2013年に当院で前立腺全摘を施行され、同意が得られた60例の前立腺癌を対象として(表3)、上部尿路上皮癌と同様、MLH1, MSH2, MSH6, PMS2のミスマッチ修復蛋白のuniversal immunohistochemical screeningを施行した。MLH1, MSH2は上部尿路上皮癌と同様の条件で良好な染色性が得られたが、MSH6およびPMS2では、前立腺癌においては大腸癌や上部尿

表3 前立腺がん患者背景

年齢		70歳 (56-76)
	6	12 (20%)
Gleason score	7	34 (57%)
	8-10	14 (23%)
	2a	9 (15%)
	2b	20 (33%)
nΤ	2c	17 (28%)
рТ	3a	10 (17%)
	3b	4 ( 7%)
	4	0 ( 0%)
nN.	0	59 (98%)
pN	1	1 ( 2%)

路上皮癌と同じ1:100の希釈倍率で実施すると、正常部での染色性も弱く、判定が困難な検体が多かったため、1:50にして実施したところ、良好な染色性が得られた。しかし、前立腺癌では全例でいずれのミスマッチ修復蛋白の欠失も認めなかった。

#### 【考察】

今回我々の検討では、4種類のミスマッチ修復 蛋白のuniversal immunohistochemical screening からは、リンチ症候群を背景と考えられる上 部尿路上皮癌の有病率は全上部尿路の5%と推 定された。これは大腸癌における有病率と同 等で、予想されたよりも高頻度であった。事 実、我々と同様に上部尿路上皮癌のuniversal immunohistochemical screeningを施行した最近 の報告でも7%と報告されている8)。一方、近年 改訂ベセスダ基準によるスクリーニングでのリン チ症候群の取りこぼしが問題とされており、我々 の検討でもリンチ症候群と考えられる症例の5/7 例は上部尿路上皮癌の診断時には改訂ベセスダ基 準を満たしていなかった。また4/7例はリンチ症 候群の臨床診断基準であるアムステルダム基準Ⅱ では臨床的に診断不可能であった。近年、その簡 便性や正確性から大腸癌ではミスマッチ修復蛋白 の universal immunohistochemical screening が 推奨されており、今回上部尿路上皮癌でも高い有

病率が認められたことより、上部尿路上皮癌でも universal screeningが推奨されるべきと考えられた。

また本検討では、リンチ症候群を背景と考えら れる上部尿路上皮癌は女性・尿管に多く認められ た。これは、これまで報告されているリンチ症候 群を背景と考えられる上部尿路上皮癌の臨床的特 徴に一致している<sup>9-11)</sup>。さらに低悪性度・低ス テージが多かったが、実際、大腸癌においても、 リンチ症候群を背景とする大腸癌は散発性大腸癌 に比べ、低ステージの比率が多く、ステージをマ ッチした検討においても予後が良いことが知られ ている12)。また、散発性の上部尿路上皮がんより も遺伝性上部尿路上皮がんの方が、低悪性度が多 く、予後が良好であることも報告されており、我々 の上部尿路上皮癌での結果に一致する<sup>13,14)</sup>。一 方、免疫染色では、MSH2を含む欠失パターンが 5/7例と多く、遺伝子検査でリンチ症候群と診断 された2例も、いずれもMSH2遺伝子の生殖細胞 系列変異変異であった。これは、過去のリンチ症 候群の泌尿器癌における欠失パターンの報告とも 合致しており、リンチ症候群を背景と考えられる 上部尿路上皮癌の発がんにおいては、ミスマッチ 修復遺伝子の中でMSH2遺伝子の生殖細胞系列 変異が特に重要な役割を果たしていると考えられ た<sup>9,15)</sup>。

リンチ症候群を背景とする大腸癌の病理学的特 徴はよく知られている。実際、60歳未満の発症で、 リンチ症候群に特徴的な病理所見を呈する大腸癌 であることが、改訂ベセスダ基準の一つにも組み 込まれている。今回の病理学的検討では、リンチ 症候群が推測される上部尿路上皮癌において、尿 路上皮癌では稀な内反性乳頭腫に類似した異型の 弱い尿路上皮癌を示すものが6/7例、茎が細く 丈の高いvillousな乳頭状尿路上皮癌を示すもの も4/7例に認められており、これらがリンチ症候 群による上部尿路上皮癌に特徴的な組織型である 可能性がある。実際にマイクロサテライト不安 定性高度を示す上部尿路上皮癌の多くでinverted growth patternを示したとする報告もある<sup>16)</sup>。今 後、検討を重ね、上部尿路上皮癌の特徴的病理学 的所見として確立する必要があるだろう。

一方で、免疫染色結果が「陰性」であっても、上部尿路上皮癌が高齢で初発として発生し、改訂ベセスダ基準やアムステルダム基準IIを満たしていない症例を多く認めた。本検討で、リンチ症候群を背景と考えられる上部尿路上皮癌患者の平均年齢は70歳であり、リンチ症候群の大腸がん症例の平均発症年齢45歳と比較するとより高齢発症であった。これは、リンチ症候群を背景と考えられる上部尿路上皮癌が低悪性度であることと関連があるのかもしれない。いずれにしろ、リンチ症候群を背景と考えられる症例であっても、比較的高齢で上部尿路上皮癌を初発として発生する症例も念頭に置く必要がある。

また、リンチ症候群を背景と考えられる前立 腺癌の有病率は、我々のuniversal immunohistochemical screeningの検討では0%であった。こ れは過去の報告に一致しない<sup>5)</sup>。しかし本研究の 対象は根治的前立腺全摘除術症例であり、転移症 例、放射線照射症例、待期療法中の症例は含まれ ていないことにその不一致の原因があるかもしれ ないが、少なくとも、日本人ではリンチ症候群と 前立腺がんの関係は、欧米で報告されている程大 きくないのかもしれない。

本研究の制限は、ミスマッチ修復蛋白のuniversal immunohistochemical screeningで染色陰性であった7例のうち2例にしか遺伝子検査に承諾を得られなかったため、リンチ症候群の正確な遺伝子診断ができなかったことである。これらは体細胞レベルでの変異の可能性もある。またミスマッチ修復遺伝子のプロモーター領域の解析や関連遺伝子の変異検索の検討も今後の課題である。

本研究では、リンチ症候群を背景と考えられる一部の泌尿器癌の臨床的および病理学的特徴が把握できた。これらは泌尿器科医に対するリンチ症候群の啓蒙にも大変意義深い研究となると思われる。大腸癌患者同様、今後、泌尿器癌患者からも泌尿器科医がリンチ症候群患者を正しく診断・把握することが可能となれば、その患者および家系の併発しうる悪性疾患の早期診断・治療につながると考えられる。

#### 【文献】

1. Thompson BA, Spurdle AB, Plazzer JP, et

- al.: Application of a 5-tiered scheme for standardized classification of 2,360 unique mismatch repair gene variants in the In-SiGHT locus-specific database. Nat Genet 46: 107-115, 2014
- Chen S, Wang W, Lee S, et al.: Prediction of germline mutations and cancer risk in the Lynch syndrome. JAMA 296: 1479-1487, 2006
- 3. Lindor NM, Petersen GM, Hadley DW, et al.: Recommendations for the care of individuals with an inherited predisposition to Lynch syndrome: a systematic review. JAMA 296: 1507-1517, 2006
- Mork M, Hubosky SG, Rouprêt M, et al.: Lynch Syndrome: A Primer for Urologists and Panel Recommendations. J Urol 194: 21-29, 2015
- 5. Ryan S, Jenkins MA, Win AK: Risk of prostate cancer in Lynch syndrome: a systematic review and meta-analysis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 23: 437-449, 2014
- 6. Weissman SM, Burt R, Church J, et al.: Identification of individuals at risk for Lynch syndrome using targeted evaluations and genetic testing: National Society of Genetic Counselors and the Collaborative Group of the Americas on Inherited Colorectal Cancer joint practice guideline. J Genet Couns 21: 484–493, 2012
- 7. Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al.: Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. J Clin Oncol 26: 5783-5788, 2008
- Harper HL, McKenney JK, Heald B, et al.: Upper tract urothelial carcinomas: frequency of association with mismatch repair protein loss and Lynch syndrome. Mod Pathol 30: 146-156, 2017
- 9. Acher P, Kiela G, Thomas K, O'Brien T: Towards a rational strategy for the surveillance of patients with Lynch syndrome

- (hereditary non-polyposis colon cancer) for upper tract transitional cell carcinoma. BJU Int 106: 300-302, 2010
- Pradere B, Lotan Y, Roupret M: Lynch syndrome in upper tract urothelial carcinoma: significance, screening, and surveillance. Curr Opin Urol 27: 48-55, 2017
- 11. Mork M, Hubosky SG, Rouprêt M, et al.: Lynch syndrome: a primer for urologists and panel recommendations. J Urol 194: 21– 29, 2015
- Watson P, Lin KM, Rodriguez-Bigas MA, et al.: Colorectal carcinoma survival among hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma family members. Cancer 83: 259-266, 1998
- 13. Audenet F, Colin P, Yates DR: French Collaborative National Database on UUT-UC et al. A proportion of hereditary upper urinary tract urothelial carcinomas are misclassified as sporadic according to a multi-institutional database analysis: proposal of

- patient-specific risk identification tool. BJU Int 110: 583-589, 2012
- 14. Hollande C, Colin P, de La Motte Rouge T: French Collaborative National Working-Group on UTUC et al. Hereditary-like urothelial carcinomas of the upper urinary tract benefit more from adjuvant cisplatin-based chemotherapy after radical nephroureterectomy than do sporadic tumours. BJU Int 113: 574-580, 2014
- Harper HL, McKenney JK, Heald B, et al.: Upper tract urothelial carcinomas: frequency of association with mismatch repair protein loss and Lynch syndrome. Mod Pathol 30: 146-156, 2017
- Hartmann A, Dietmaier W, Hofstädter F, Burgart LJ, Cheville JC, Blaszyk H: Urothelial carcinoma of the upper urinary tract: inverted growth pattern is predictive of microsatellite instability. Hum Pathol 34: 222– 227, 2003

## (12) 病理診断

## 腫瘍特異的蛍光プローブの検索と病理診断への応用に関する研究

井下 尚子、日野 るみ、三浦 大周 武田 英彦、飯塚 敏郎、布袋屋 修

#### 【背景】

【目的と対象】

近年、国内で開発された蛍光プローブが癌特異的に反応することが報告され、乳癌をはじめ、脳腫瘍や肺癌に対する基礎的研究ならびに臨床応用に向けての開発が進んでいる。本プローブは、ある特定の酵素の活性によって代謝され、蛍光特性が変化し検出できるもので、腫瘍が持つ酵素の種類により反応可能なプローブは異なり、現在何百種類ものプローブが開発されている。タンパク質の動的な機能の理解を可能にする、生物試料内で起こる現象を可視化できる研究ツールのひとつとして、生物学研究、臨床診断、阻害剤開発など、個々の病態関連タンパク質の機能解明に有用である。

新たな検査法として注目されている蛍光プローブの中から、各腫瘍特異的プローブを抽出し、その制度を検討することを目的とする。今回の検討では、①甲状腺腫瘍では、未だ検査に有効な蛍光プローブは知られていないが、パイロット研究において有用性が疑われたGGT活性検出プローブ

を使用して、手術検体において癌特異的な蛍光性の有無を検討した。②食道ESD検体では既報告の蛍光プローブ(DPP-IV活性検出プローブ)を用いて検討した。

#### 【方法】

甲状腺手術検体あるいは食道ESD検体で、病理診断に影響のない範囲で検体を用い、蛍光プローブ液を滴加し、蛍光性を確認した。非腫瘍部を対照とした。各検体はすべて蛍光プローブ検討後にHE標本を作製し、病理学的に確認した。HE染色での腫瘍部と蛍光性を得られた領域が一致した場合、蛍光プローブは腫瘍特異的な蛍光プローブと判断した。

#### 【結果】

①甲状腺手術検体24症例(甲状腺乳頭癌19例、 腺腫様甲状腺腫3例、甲状腺濾胞腺腫1例、慢性 甲状腺炎1例)で検討した。GGT活性検出プロー ブにより癌を検出できたのは、甲状腺乳頭癌19 例中19例の癌部であった(図1)。甲状腺乳頭癌 症例の非癌部や腺腫瘍甲状腺腫、濾胞腺腫、甲状



図 1 甲状腺乳頭癌の 1 例。蛍光プローブ滴下後 10 分。右が腫瘍部、左は非腫瘍部の甲状腺組織。

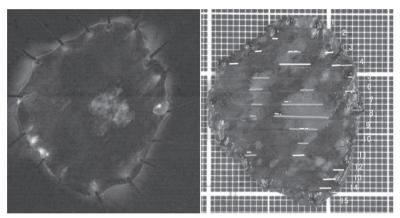


図 2 食道ESDの1例。左は蛍光。右は病理切り出し図に示した病変範囲。腫瘍部に一致し 蛍光を発するが、固定用の針刺部、びらん部も蛍光性を有している。

腺炎については蛍光性を有さなかった。蛍光プローブが癌部で明確に確認できたのは30秒~1分で、早い症例では3秒程度で確認可能であった。②食道ESD検体30症例で検討した。DPP-IV活性検出プローブでは、びらん部でのとり込みが強く、腫瘍部との鑑別が困難であった(図2)。

#### 【考察と今後の展望】

①GGT活性検出プローブは甲状腺乳頭癌19症例すべての癌部に蛍光性を有した。非癌部や非腫瘍性病変で蛍光性を有さないことから、本プローブは甲状腺乳頭癌に特異的といえる。さらに、本検出法は癌特異的というだけではなく、検出時間は1分以内と短く、手技も簡単であることから、

迅速でかつ簡便な癌検出法といえる。今後は、この新しい迅速で簡便な癌検出法の確立に向けて、さらに症例数を増やし検討していきたい。また、甲状腺乳頭癌は、既存のcell lineを用いて、蛍光性の確認を行う。生体組織内には、自家蛍光性を持つ膠原線維などが介在するため、腫瘍細胞からの蛍光性であること、また腫瘍細胞内での局在を、共焦点顕微鏡を用いて確認する。

②食道では、既報告では癌特異的とされていたが、びらん部など非腫瘍性変化も検出した。 DPP-IV活性検出プローブは非特異的と判断されるため、他の酵素により反応する、よりよいプロープの適応を検討する必要がある。

## (13) 感染症疾患

# Helicobacter cinaedi(ヘリコバクター・シネディ)の 感染経路と薬剤感受性に関する研究

荒岡 秀樹、馬場 勝、米山 彰子

#### 【要約】

先行研究で、Helicobacter cinaedi は当院にお いて血液培養陽性例の2.2%を占めており、感染 症の原因菌として重要な細菌である。H. cinaedi 菌血症の感染経路は未だ明らかにされていない。 これまでの報告において、腸管からのbacterial translocationが示唆されているが、証明されたも のはない。本年度の研究の目的はこの感染経路を 明らかにすることである。2009年3月から2013 年5月までに、虎の門病院本院、虎の門病院分 院でH. cinaedi 菌血症を発症した症例のうち、血 液培養と便培養の双方からH. cinaedi が分離され たものを抽出した。H. cinaediはgyrB-targeted PCRを用いて同定した。パルスフィールド・ゲ ル電気泳動(PFGE)法を用いて菌株の遺伝子の 相同性を解析した。研究期間中、21患者で血液 培養と便培養の双方からH. cinaediを分離するこ とに成功した。PFGE法の結果、9患者18菌株が 菌株の相同性について評価可能であり、血液由来 のH. cinaedi 菌株と便由来のH. cinaedi 菌株の遺 伝子が一致した。評価可能であった9患者18菌 株について再度PFGE法を施行し、再現性を確認 した。これら9患者の臨床背景は、免疫不全を有 し、抗癌薬やステロイドが投与されている患者が 多く、腸管免疫が低下していたことが示唆された。 本研究は、H. cinaedi 菌血症の感染経路のひとつ として、腸管からのbacterial translocationが証 明された初めての報告である。以上の結果をまと めて、Helicobacter誌に掲載した。

#### 【目的】

Helicobacter cinaedi は腸管在位.Helicobacter属のひとつであり、ヒトに感染を起こす腸管在位.Helicobacter属のなかで最も報告が多い菌種であ

る。H. cinaediは、1984年に米国においてホモセ クシャルな男性の直腸から初めて分離された。こ れまで主に免疫不全患者における感染症の原因菌 として認識されてきた。その臨床症状は、蜂窩織 炎、腸炎、髄膜炎、感染性動脈瘤、化膿性脊椎炎 など多彩であるが、ほとんどは血液培養から本菌 が検出される(菌血症)ことで認知される。先行 研究で、H. cinaedi は当院において血液培養陽性 例の2.2%を占めており<sup>1)</sup>、感染症の原因菌とし て重要な細菌である。当院のこの検出率は、日本 における多施設共同研究2)と比較すると、高い 傾向にある。H. cinaedi 南血症の感染経路は未だ 明らかにされていない。これまでの研究報告にお いて、腸管からのbacterial translocationが示唆 されている<sup>1,3)</sup>が、証明されたものはない。本年 度の研究の目的はこの感染経路を明らかにするこ とである。

#### 【方法】

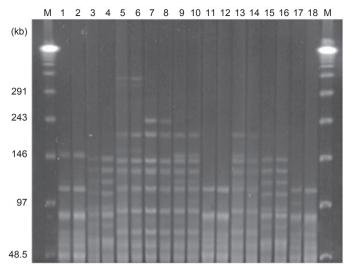
2009年3月から2013年5月までに、虎の門病院本院、虎の門病院分院で*H. cinaedi* 菌血症を発症した症例のうち、血液培養と便培養の双方から*H. cinaedi* が分離されたものを抽出した。血液培養システムはBACTEC 9240とBACTEC FX system (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA) を用いた。血液培養観察期間は7日間とした。*H. cinaedi* はgyrBtargeted PCR<sup>4)</sup>を用いて同定した。パルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法を用いて菌株の遺伝子の相同性を解析した。

PFGE法は以下の条件で実施した。

制限酵素: Spe I (Takara Bio Inc.)

20 unit の制限酵素で一晩反応、37℃。

電気泳動: 電圧 6 V/cm、120° included angle、



Pulsed-field gel electrophoresis patterns of Spel digested *Helicobacter cinaedi*. Lines 1/2, blood/stool of patient no. 1; lines 3/4, blood/stool of patient no. 2; lines 5/6, blood /stool of patient no. 3; lines 7/8, blood/stool of patient no. 4; lines 9/10, blood/stool of patient no. 5; lines 11/12, blood/stool of patient no. 6; lines 13/14, blood/stool of patient no. 7; lines 15/16, blood/stool of patient no. 8; lines 17/18, blood/stool of patient no. 9; and line M, lambda ladder (Bio-Rad)

図 1 PFGE法で得られた結果 (Spe I) $^{5)}$ : 9患者全てにおいて便由来と血液由来の菌株の PFGE型が完全一致した。

表 1 *H. cinaedi* 菌血症 9 患者の臨床背景<sup>5)</sup> 免疫不全を有し、抗癌薬やステロイドが投与されている患者が多かった。

Patient	Sex	Age	Underlying disease	Symptoms	Steroids	Anticancer chemotherapy	CA/HA/N	HIV	Systemic antimicro- bial treatment	Duration of systemic antimicrobial treatment	Selective digestive decontamination	Outcome
1	М	56	Diabetes mellitus	Fever; cellulitis	No	No	CA	Negative	Cefotiam; meropenem	21 d	No	Survived
2	М	73	Lung cancer; colon cancer	Fever (febrile neutropenia)	Yes	Yes	N	Negative	Cefepime; ampicillin/ sulbactam	28 d	No	Survived
3	W	38	None	Cellulitis	No	No	CA	Negative	Amoxicillin	35 d	Yes; kanamycin; 22 d	Survived
4	М	42	Acute lymphoid leukemia; post-cord blood transplantation; diabetes mellitus	Fever (febrile neutropenia)	No	Yes	N	Negative	Piperacillin/ tazobactam	22 d	No	Survived
5	W	75	Cushing's disease	Fever; cellulitis	Yes	No	N	N/A	Cefazolin; amoxicillin	21 d	No	Survived
6	W	65	Chronic kidney disease; post-renal transplantation; hepatitis C	Fever; cellulitis	Yes	No	N	Negative	Amoxicillin	21 d	No	Survived
7	М	57	Hearing loss; cochlear implant	Fever; cellulitis	Yes	No	N	Negative	Flomoxef; amoxicillin	28 d	Yes; kanamycin; 14 d	Survived
8	М	72	Chronic kidney disease; hemodialysis; granulomatosis with polyangiitis	Fever; cellulitis	Yes	No	НА	Negative	Meropenem	42 d	No	Survived
9	W	78	Follicular lymphoma	Fever	Yes	Yes	НА	N/A	Ceftriaxone; piperacillin/ tazobactam; amoxicillin	30 d	No	Survived

M, man; W, woman; CA, community-acquired bloodstream infection; HA, health care-associated bloodstream infection; N, nosocomial bloodstream infection; N/A, not applicable.

スイッチングタイム2.9-17.4 seconds、泳動時間27時間、1% agarose gels、0.5×TBE buffer。 【結果】

研究期間中、71患者においてH. cinaedi 菌血症を発症した。うち、21患者で血液培養と便培養の双方からH. cinaediを分離することに成功した。PFGE法の結果、評価可能であったものは9患者18菌株であり、他の12患者24菌株はバンドが得られなかった。評価可能であった9患者全てにおいて、血液由来のH. cinaedi 菌株と便由来のH. cinaedi 菌株の遺伝子が一致した。評価可能であった9患者18菌株を、同じ条件で再度PFGE法により検討した。結果を図1に示す。9患者全てにおいて、血液由来と便由来の菌株の遺伝子が一致しており、再現性を確認することができた。

これら9患者の臨床背景は、免疫不全を有し、抗癌薬やステロイドが投与されている患者が多く、腸管免疫が低下していたことが示唆された(**表1**)。 【考察】

今回の研究において、下部消化管(腸管)から 血液中へのbacterial translocationが、1つの主要 なH. cinaedi 菌血症の感染経路であることを初め て証明した。

本研究のlimitationはPFGE法でバンドを得られず、評価不能な菌株が多かったことである。Campylobacter属では、内因性のendonucleaseがDNAを分解することが報告されており<sup>6)</sup>、これが一因と考えられる。このlimitationを補うために、PFGE法以外での評価も今後検討される。菌の相同性を評価する方法としてはPFGE法がgold standardであるが、それ以外にもmultilocus sequence typing (MLST)やCRISPR loci analysisが有用との報告があり<sup>7.8)</sup>、今後は次世代シーケンサーを用いたゲノム解析も試みられると思われる。これらを組み合わせた検討が今後の課題である。

#### 【結語】

今回の研究において、下部消化管(腸管)から血液中へのbacterial translocationが、1つの主要な*H. cinaedi* 菌血症の感染経路であることを初めて証明した。

以上の結果をまとめて、Helicobacter誌に掲載

した5)。

#### 【文献】

- 1. Araoka H, Baba M, Kimura M, Abe M, Inagawa H, Yoneyama A: Clinical characteristics of bacteremia caused by *Helicobacter cinaedi* and time required for blood cultures to become positive. J Clin Microbiol 52: 1519–1522, 2014
- Matsumoto T, Goto M, Murakami H, Tanaka T, Nishiyama H, Ono E, Okada C, Sawabe E, Yagoshi M, Yoneyama A, Okuzumi K, Tateda K, Misawa N, Yamaguchi K: Multicenter study to evaluate bloodstream infection by *Helicobacter cinaedi* in Japan. J Clin Microbiol 45: 2853-2857, 2007
- 3. Imafuku A, Araoka H, Tanaka K, Marui Y, Sawa N, Ubara Y, Takaichi K, Ishii Y, Tomikawa S: *Helicobacter cinaedi* bacteremia in four renal transplant patients: clinical features and an important suggestion regarding the route of infection. Transpl Infect Dis 18: 132-136, 2016
- Minauchi K, Takahashi S, Sakai T, Kondo M, Shibayama K, Arakawa Y, Mukai M: The nosocomial transmission of *Helico-bacter cinaedi* infections in immunocompromised patients. Intern Med 49: 1733-1739, 2010
- Araoka H, Baba M, Okada C, Kimura M, Sato T, Yatomi Y, Moriya K, Yoneyama A: First evidence of bacterial translocation from the intestinal tract as a route of *Heli*cobacter cinaedi bacteremia. Helicobacter 23. doi: 10.1111/hel.12458, 2018
- Gibson JR, Sutherland K, Owen RJ: Inhibition of DNAse activity in PFGE analysis of DNA from *Campylobacter jejuni*. Lett Appl Microbiol 19: 357–358, 1994
- Rimbara E, Mori S, Matsui M, Suzuki S, Wachino J, Kawamura Y, Shen Z, Fox JG, Shibayama K: Molecular epidemiologic analvsis and antimicrobial resistance of *Helico*-

*bacter cinaedi* isolated from seven hospitals in Japan. J Clin Microbiol 50: 2553-2560, 2012

8. Tomida J, Morita Y, Shibayama K, Kiku-

chi K, Sawa T, Akaike T, Kawamura Y: Diversity and microevolution of CRISPR loci in *Helicobacter cinaedi*. PLoS One12: e0186241, 2017

## (14) 高齢者総合診断科疾患

## アルツハイマー型認知症の超早期診断のための臨床的 バイオマーカーの検索

井桁 之総、逸見 功<sup>1</sup> 日本赤十字看護大学<sup>1</sup>

#### 【背景】

本邦における認知症患者数は2012年に462万人 に達し、その予備軍である軽度認知障害(以下 MCI) は400万人いると発表された。その約6割 を占めるアルツハイマー型認知症(AD)には現 在確立された治療方法はない。ADの原因蛋白で あるアミロイド B 蛋白(以下 AB)とタウ蛋白(以 下タウ) には神経毒性があり、その病理像は A β の蓄積(老人斑)とリン酸化タウの蓄積(神経原 線維変化)である。AβはAD発症の約25年前か ら増加(髄液 A ß 42 は低下) し、タウは約10年 前から上昇する。しかしAD病態修飾薬(根治薬) の開発は失敗し、現承認薬の効果は限定的であり 早期に介入する必要がある。2010年米国国立加 齢研究所/米国アルツハイマー病協会 (NIAAA: National Institute on aging/Alzheimer's Association)は診断基準を改変し、ADの全経過 & preclinical AD, MCI due to AD, AD dementia の三段階に分類し、髄液AB42低下を認めれ ばpreclinical ADの診断が可能とした(米国 国立加齢研究所 (National Institute on aging: NIA) /米国アルツハイマー病協会 (Alzheimer's Association: AAから、2010)。問題なのは、早 期診断や発症前診断に必要な生化学的、臨床 的なバイオマーカーが欠如していることであ る。AD脳ではABが増加し、凝集し形成された オリゴマーが神経毒性を引き起こす。またAβ 増加に続きリン酸化タウ蛋白が増加し、神経毒 性をもたらしADが進行し、神経細胞障害によっ て髄液中のタウが増加する機序が想定されてい る<sup>1)</sup>。主に臨床症状と相関するリン酸化タウ蓄積 による神経原線維変化の分布(Braak分類)はI

- VIステージに分類される。 タウは嗅内皮質から たまり始め<sup>2)</sup>このステージがNIAAA診断基準の preclinical stage(Braak stage I - II)に相当する。 preclinical ADのタウの嗅内皮質への蓄積は、嗅 覚障害を呈することが予想される。タウが海馬に 達すると MCI due to AD stage (Braak stage II - IV) になり、側副溝 (collateral sulcus) を越え 後頭側頭回(側頭葉)に達するとアルツハイマー 型認知症に陥る(葛原・井原学説 1989) (Braak stage V-VI)。また、ADでは正常と比し5%以 上の体重減少を約2倍認め、発症の1~2年前か ら始まり、Preclinical ADでは認知機能障害と運 動機能低下は潜在的につながっている3)。さらに 糖負荷後の2時間の血糖値、空腹時インスリン値、 インスリン抵抗性(HOMA-IR)の上昇はアルツ ハイマー型認知症の主な病理像である老人斑と有 意に相関する<sup>4)</sup>。そこで、ADの超早期診断を行 ううえで嗅覚、サルコペニアの指標やインスリン 抵抗性に関する要因が臨床的なバイオマーカーと なりうるかどうかを検討した。

#### 【対象および方法】

2017/7月から2018/1月まで認知症外来を受診し髄液採取の同意を得た患者であり①MCI(日常生活動作に問題がなくWMSR (Wecheler Memory Scale-Reviced)で同年齢よりも-SD以下の患者)と、②AD dementia (上記NIA-AA 臨床診断基準を満たした患者)の2群にわけ、MCI (9例)とAD (6例)の2群で発症の有意差の検討を行った(さらに正常コントロールを加えた各群30例、3群間検定の計画だが検体が揃わず中間報告として2群間比較を行った)。

ADとMCIの2群間比較の要因を①リン酸化タ

ウ蛋白 ②四肢骨格筋肉量SMI(skeletal muscle mass index)③歩行速度 ④嗅覚(Open Essence; 嗅覚同定能力研究用カードキット)⑤サルコペニアの有無 ⑥インスリン抵抗性(HOMA-R)の有無 ⑦インスリン分泌能(HOMA- $\beta$ )の有無とし、(i) ①から④については ウィルコクソン順位和検定、(ii) ⑤から⑦についてはフィッシャーの直接確率法、(iii) ②SMI、③歩行速度、④嗅覚能と論理的記憶 II との相関関係をスピアマンの順位相関係数で解析した。

リン酸化タウはBML株式会社で測定されたデータを使用し、②四肢骨格筋肉量(skeletal muscle mass index: SMI)は下記のサルコペニア診断基準の項目のひとつであり、その推定式は、男性: SMI(kg/m²)=0.326 × BMI - 0.047 × 腹囲(cm)-0.011 × 年齢(歳) + 5.135、女性: SMI(kg/m²)=0.156 × BMI - 0.044 × 握力(kg)-0.010 × 腹囲(cm) + 2.747とした。③歩行速度は5メートル歩行の時間を3回計測して求めた

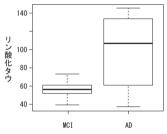
平均値をとった。さらに④嗅覚機能検査はOpen essence(嗅覚同定能力研究用カードキット)という12種類のカードに日本人に親しみのある香りを閉じ込め、こすって使用する嗅覚研究用のキットを用いた。⑤サルコペニアの判定基準は、2014年アジアワーキンググループ(AWGS)による判定基準を用いた $^{5}$ )。⑥HOMA-RはIRI(早朝空腹時血中インスリン濃度)×FBS(早朝空腹時血糖)×1/405とし1以下を正常とした(HOMA-R1以上が抵抗性あり)。⑦HOMA- $\beta$ はIRI(早朝空腹時血糖)一名3とし $^{40}$ 0%を正常とした(40%以下でインスリン分泌能低下あり)。

#### 【結果】

(i)属性はAD群 (n=6,年齢:76.0±2.8歳,教育年数15.67±1.8,MMSE:22.7±3.6)、MCI群 (n=9,年齢:71.3±8.0歳,教育年数15.56±1.3,MMSE:28.3±1.3)であった。

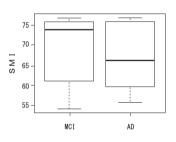
MCIからADの診断においてリン酸化タウ蛋

# リン酸化タウの検討



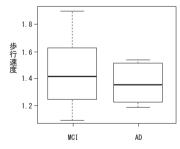
P-Tauの中央値が51増加した (p=.068)

#### SMI (四肢骨格筋肉量) の検討



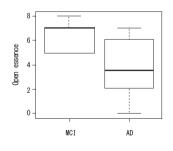
SMIの有意差なし (p=. 768)

## 歩行速度の検討



歩行速度の有意差なし (p=. 456)

嗅覚能 (Open essence) の検討



嗅覚検査の中央値は3.5減少した (p=.041)

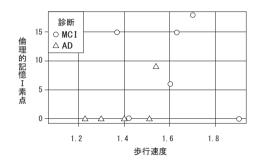
図 1 各要因(リン酸化タウ蛋白 ② SMI ③歩行速度 ④嗅覚)と診断との関連性

		MCI (n=9)	AD (n=6)	p値	
サルコペニア	あり	1 (11%)	2 (33%)	0.53	
777 - 7	なし	8 (89%)	4 (67%)		
インスリン抵抗性	あり	7 (78%)	5 (83%)	1.00	
インベリン抵抗性	なし	2 (22%)	1 (17%)		
インスリン分泌能低下	あり	2 (22%)	1 (17%)	1.00	
インヘリンが必能似下	なし	7 (78%)	5 (83%)	1.00	

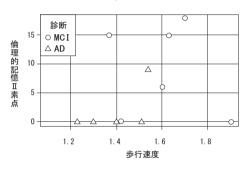
注) Fisher's exact test

図 2 各要因(サルコペニア、インスリン抵抗性(HOMS-R)、インスリン分泌能低下)と診断 との関連性: MCIとAD間に5%水準で有意差のある要因はなかった。

配布図. Spearman's rho=0.08



配布図. Spearman's rho=0.08



配布図. Spearman's rho=0.04

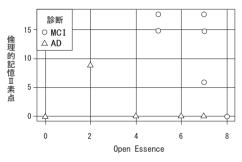


図 3 WMSRの倫理的記憶ⅡとSMI、歩行速度、Open Essence(嗅覚能)の相関: 論理的記憶Ⅱ素点と有意な相関を示した素因はなかった。

白、SM、歩行速度、嗅覚の各要因についてウィルコクソン順位和検定を行い、リン酸化タウ(P-Tau)、SMI、歩行速度、嗅覚能の各要因で有意水準10%においてp-Tauで有意差がありその中央値が51増加した(p=0.068)。同様に有意水準5%において嗅覚検査で有意差があり、その中

央値は3.5減少した(p=0.041)。SMIと歩行速度 で有意差はなかった(図1)。

(ii) サルコペニア、インスリン抵抗性 (HOMA-R)、インスリン分泌能 (HOMA- $\beta$ ) の各要因の有無に MCIと AD間でフィッシャーの直接確率法を用いて 解析したが有意差はなかった (図2)。

(iii) SMI、歩行速度、嗅覚能と論理的記憶 II 素点の相関関係をスピアマンの順位相関係数で解析したが有意な相関を示した要因はなかった(図 3)。

#### 【結論】

MCIからADに移行したかどうかの判定にリン酸化タウ濃度と嗅覚検査が臨床的バイオマーカーとして有用となる可能性があった。

【考察】ADの臨床的早期診断マーカーとしての 嗅覚障害が確立されつつある。嗅球には嗅内皮質 より早期にNFTが沈着し、その後spreadするこ とが知られている<sup>6)</sup>。一方でNFT(神経原線維 変化)のBraak分類では I-Ⅱの嗅内野ステージ (正常) ではタウタンパクはSt I 移行嗅内野 (海 馬傍回)から始まりStⅡ嗅内野におよぶ。Ⅲ-Ⅳ 辺縁系ステージではStⅢ固有海馬に達し、StⅣ 固有海馬を充満する。さらにV-VI新皮質ステー ジ(Dementia)ではSt V 新皮質連合野におよび St VI 固有野に到達する。このBraak 分類のステー ジをNIAAA分類で照らし合わせると嗅内野ステ ージ (I-II) は preclinical stage に相当し辺縁 系ステージ(Ⅲ-Ⅳ)はMCIに相当する。さらに 新皮質ステージは認知症発症時期 (AD-Dementia ステージ) に相当する。よって嗅内野の障害によ って生じる嗅覚障害は preclinical ADと MCIの鑑 別で差がでると考えられるが、今回はMCIとAD 群間で有意差がでた。AD dementiaステージに なると判断力が極端に低下しているため嗅覚障害 を見ているのではなく、認知機能を評価している 可能性があり AD dementia ステージのうち early stage of AD (属性でADのMMSE: 22.7 ± 3.6) の患者とした。今後は標本サイズを増やしコント ロール、MCI、AD dementiaとの3群間比較を行 う。また低体重はADの危険因子であり、AD発 症の1、2年前からサルコペニアが発症し、インスリン抵抗性はAD発症の直前に最大になるといわれる。インスリン抵抗性の増強は末梢でのインスリン必要量が最大になり脳内でのインスリン量が減ることを意味し、結果として脳内インスリンシグナル伝達が低下し短期記憶障害とAD原因蛋白であるリン酸化タウ蛋白が増加することで症状の悪化が予想される。今回、サルコペニア、インスリン抵抗性、インスリン分泌能の要因では有意差がでなかった。しかし、あくまでも途中経過での解析であり、標本サイズを増やせばMCIとAD群間で有意差がでなかった要因も正常コントロールとMCI間で有意差がでる可能性がある。今後、標本サイズを増やした統計解析を行う予定である。

#### 【文献】

- Hardy JA, et al.: Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. Science 256: 184-185, 1992
- Kovács T: Mechanisms of olfactory dysfunction in aging and neurodegenerative disorders. Ageing Res Rev 3: 215-232, 2004
- 3. Buchman AS, et al.: Loss of motor function in preclinical Alzheimer's disease. Expert Rev Neurother 11: 665-676, 2011
- 4. 清原 裕: 認知症のコホート研究: 久山町研究. 臨床神経 51: 906-909, 2011
- 5. Volpato S, et al.: Cardiovascular disease, interleukin-6, and risk of mortality in older women: the women's health and aging study. Circulation 103: 947-953, 2001
- Kovács T: Mechanisms of olfactory dysfunction in aging and neurodegenerative disorders. Ageing Res Rev 3: 215-232, 2004

## (15) 放射線科疾患

# MRIによる肝臓脂肪および鉄定量評価のためのファントムによる定量性の検討

福澤 圭、小久保 宇

#### 【要約】

脂肪肝を背景として肝炎や肝硬変が進行する 病態が明らかとなり、肝臓のMRI検査において は、Proton Density Fat Fraction (PDFF) によ る脂肪沈着やT2\*値による鉄沈着評価などが求 められている。MRIのメリットは肝生検と比較 して侵襲性が低いことであるが、正確な定量値の 再現性や鉄の存在が定量値に与える影響などが十 分に明らかになっていないのが現状である。本研 究ではこれらの課題について、正確な脂肪含有率 を有するファントム (模型) や、鉄成分を含むフ ァントムを自作して、肝臓の脂肪および鉄定量評 価に使用されるMRIの各種撮像シーケンスの測 定値の比較や、鉄の存在が測定結果に与える影響 を明らかにした。ファントムの脂肪含有量は水と サラダ油の比率から脂肪量0%から50%まで10% ずつ変化させた。また、脂肪量0%および20%の ファントムにおいて鉄含有率を変化させたものも 作成した。ファントムを3テスラMRIの6point modified DIXON (6mDixon) 法およびパラメー ターの異なる4種類のMR-Spectroscopy (MRS) で撮影した。ファントム実験の結果、いずれの手 法もファントムの脂肪含有率と測定値の間に正の 相関関係を認めたが、Bland-Altman Plotにて、 6 mDixonと MRSの multi-echo STEAM 法の測定 誤差が少なかった。また、鉄含有率が上昇する とMRSは脂肪量を過大評価する傾向があったが、 6mDixonでは鉄が高濃度であってもほぼ正確な 測定が可能であった。一方で、鉄の存在によって 短縮することが知られているT2\*値は鉄が存在 しないファントムにおいても、脂肪含有量の上昇 に伴ってT2\*値が低下する傾向があり、鉄のみ に特異的なパラメーターではないことが示唆され た。本研究結果から、慢性肝疾患等を対象とした 肝臓脂肪および鉄の定量には、6mDixon法が適 していると考えられ、鉄存在下においても正確な 定量値を提供することが可能な手法であると考え られた。

#### 【目的】

MRIによる脂肪定量の手法は多数あり、 6mDixonでは撮像によって得られたデータから 各種バイアスの補正と信号強度の計算が行われ、 Proton Density Fat Fraction (PDFF)-MAP & 鉄沈着を反映するとされるT2\*-MAPなどが得 られる。MRSではベースの撮像シーケンスが異 なる、point-resolved spectroscopy (PRESS) 法 E stimulated echo acquisition mode (STEAM) 法があり、さらにデータのサンプリング方法の違 いからSingle TEとMulti TEに分けられる。過 去には、肝生検の結果との比較やファントムによ るシーケンス評価などが行われきた $^{1)}$ 。しかし、 これらすべての手法を鉄の有無を考慮した同一フ ァントムによって比較した研究はないため、本研 究の目的は、ファントムの脂肪含有率とこれら各 種法の脂肪定量値の関係を総合的に比較すること とした。また、6mDixonによるT2\*値が鉄の有 無によってどのような影響を受けるかについても 検討した。

#### 【方法】

ファントムは一辺が85mmのプラスチック製容器に蒸留水とサラダ油を混合したものを封入して作成した。水と油を混ぜ合わせる比率を変化させることで、脂肪含有量が0,10,20,30,40,50%となるように調整し、生体の肝臓と近い緩和時間となるように1%のAgarで固定した。さらに、脂肪含有量が0%と20%のものにおいて、

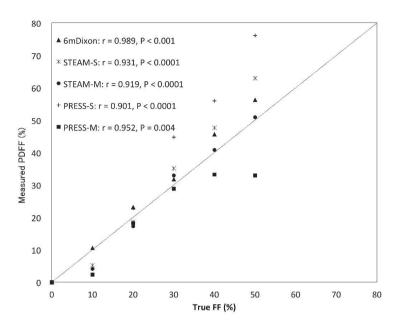


図 1 Measured PDFF と True FF の関係

超常磁性酸化鉄粒子コロイド製剤を0.0.05.0.1. 0.2. 0.4mM ずつ混ぜて、鉄含有率を調整したも のを作成した。すべての溶液調整操作は、マイ クロピペットと電子天秤を用いて正確に調整し た。水と油の混合においては分離を避けるため に、乳化剤としてレシチンを使用してハンドミ キサーで混ぜ合わせた。作成したファントムを3 テスラMRI装置の6mDixon法とMRSで撮影し た。MRSはPRESS法とSTEAM法を使用し、そ れぞれSingle TEとMulti TEで撮影した。実際 のファントムの脂肪含有量をTrue Fat Fraction (True-FF)、MRIによって得られた定量値を Measured-PDFFとし、両者の関係を比較した。 T2\*値についても合わせて検討した。統計解析に は、Pearsonの相関分析およびBland-Altman解 析を用いた。

#### 【結果】

図1にMRIの各種法によるMeasured-PDFFと True-FFの関係を示す。いずれの手法もTrue-FFと強い正の相関関係であった(r=0.901-0.989, all P<0.005)。Bland-Altman解析の結果、測定誤差が少なかった手法は6mDixon(平均誤差

2.9%)と multi-echo STEAM(平均誤差-0.7%)の2つであった。図2に両手法のBland-Altman Plotの結果を示す。図3にTrue-FFを20%に固定し鉄濃度を変化させたファントムのPDFF測定結果を示す。鉄含有率が上昇するとMRSの各種法は脂肪量を過大評価する傾向があったが、6mDixonでは鉄が高濃度であってもほぼ正確な測定が可能であった。図4に鉄の有無によるT2\*値の変化を示す。T2\*値は鉄濃度と負の相関関係を認めた(r=-0.909, P=0.0326)。一方でT2\*値はTrue-FFとも負の相関関係を認めた(r=-0.942. P=0.005)。

#### 【考察】

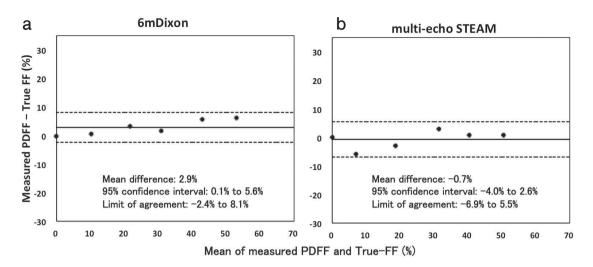


図 2 Bland-Altman plots for PDFF. a) 6mDixon, b) multi-echo STEAM

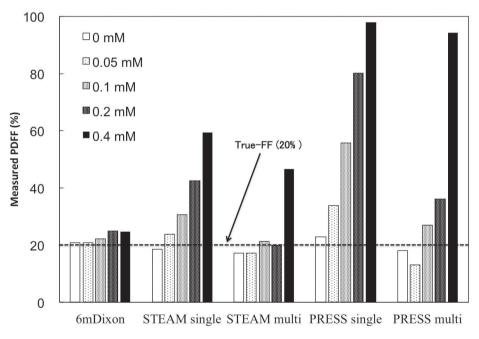


図3 PDFF測定値と鉄濃度の関係

はmulti-echo法によって補正することが可能とされているが、鉄が高濃度になると補正そのものが困難であった。一方で、6mDixon法はMRSよりも非常に短いエコータイムであり、6つのechoの取得による補正が行われるため、鉄が高濃度な

状況であっても正確なPDFF測定が可能であったと考える。今回作成した最も鉄濃度が高いファントムのT2\*値は4.6msであり、ヘモジデローシスに相当する鉄沈着状態を再現できていると考える。以上のことから、肝臓の脂肪定量に最も適

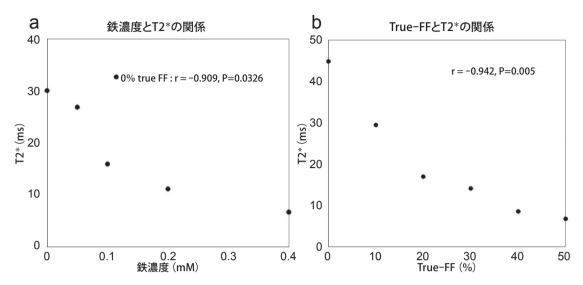


図 4 T2\*値とa) 鉄濃度およびb) True-FFの関係

した撮像方法は6mDixonであることが明らかになった。一方で、鉄の存在によって短縮すると考えられていたT2\*値<sup>2)</sup> は、脂肪の存在によっても短縮することが明らかとなり、臨床での使用に注意が必要であると考える。今後、生体におけるPDFFと肝生検結果の比較や、T2\*に代わる肝臓の鉄沈着を特異的に定量できる手法を検討していきたい。

#### 【文献】

 Kukuk GM, et al.: Comparison between modified Dixon MRI techniques, MR spectroscopic relaxometry, and different histologic quantification methods in the assess-

- ment of hepatic steatosis. Eur Radiol 25: 2869-2879, 2015
- Alam MH, Auger D, McGill LA, Smith GC, He T, Izgi C, et al.: Comparison of 3 T and 1.5 T for T2\* magnetic resonance of tissue iron. J Cardiovasc Magn Reson 18: 40, 2016

### 【発表に関する事項】

 Fukuzawa K, Tatsuya H, Saitoh S,et al.: Evaluation of six-point modified Dixon and magnetic resonance spectroscopy for fat quantification: a fat-water-iron phantom study. Radiol Phys Technol 10: 349-358, 2017